

---

# Untersuchungen zum N<sub>2</sub>O-Metabolismus des Nitrat-ammonifizierenden Bakteriums *Wolinella succinogenes*



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genemigte

Dissertation von

Dipl.-Biologin Monique Luckmann

aus Grevesmühlen

1. Referent: Prof. Dr. Jörg Simon

2. Referentin: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer

Tag der Einreichung: 11.03.2014

Tag der mündlichen Prüfung: 09.05.2014

Darmstadt 2014

D17

---

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
2.1. Distickstoffmonoxid	3
2.2. Denitrifikation	5
2.2.1. N <sub>2</sub> O-Reduktase	8
2.2.2. Das <i>nos</i> -Gencluster	9
2.3. Respiratorische Nitrat-Ammonifikation	10
2.3.1. <i>Wolinella succinogenes</i>	11
2.3.2. cNosZ-Reduktase aus <i>W. succinogenes</i>	12
2.4. Ziel der Arbeit	15
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>16</b>
3.1. Organismen, Plasmide und Oligonukleotide	16
3.1.1. Organismen	16
3.1.2. Plasmide und Oligonukleotide	17
3.2. Medien und Supplemente	21
3.2.1. Nährmedien und Supplemente für die Zucht von <i>Wolinella succinogenes</i>	21
3.2.2. Nährmedium für <i>Escherichia coli</i>	24
3.3. Kultivierung von Bakterien	24
3.3.1. Zellzucht von <i>Wolinella succinogenes</i>	24
3.3.2. Zellzucht von <i>Escherichia coli</i>	25
3.3.3. Bestimmung der Zelldichte	25
3.3.4. Zellernte	25
3.3.5. Zellaufschluss und Fraktionierung	25
3.4. Bestimmung der Enzym- und Elektronentransportaktivität	26
3.4.1. Reduktion von N <sub>2</sub> O mit reduziertem Benzylviologen	26
3.4.2. Reduktion von N <sub>2</sub> O mit reduziertem Pferdeherzcytochrom	26
3.4.3. Elektronentransport von Formiat zu N <sub>2</sub> O	27
3.5. Molekularbiologische Methoden	27
3.5.1. Isolierung von Nukleinsäuren	27
3.5.2. Agarose-Gelelektrophorese	28
3.5.3. Amplifikation von DNA-Fragmenten	28
3.5.4. Reinigung von DNA-Fragmenten	29
3.5.5. Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	29
3.5.6. Sequenzanalyse doppelsträngiger DNA	29
3.5.7. Transformation von <i>Escherichia coli</i>	29
3.5.8. Transformation von <i>Wolinella succinogenes</i>	30
3.6. Biochemische Methoden	30
3.6.1. Bestimmung von Nitrat	30
3.6.2. Bestimmung von Nitrit	31
3.6.3. Bestimmung von Formiat	31

3.6.4.	Bestimmung von NO, N <sub>2</sub> O und N <sub>2</sub>	32
3.6.5.	Proteinbestimmung nach der Biuret-Methode mit KCN	33
3.6.6.	Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
3.6.7.	Heterologe Produktion von Proteinen	36
3.6.8.	<i>Strep</i> -Tactin-Affinitätschromatographie	36
3.7.	<b>ELISA</b>	37
4.	<b>ERGEBNISSE</b>	38
4.1.	Charakterisierung des N <sub>2</sub> O-Stoffwechsels in <i>W. succinogenes</i> Stämmen	38
4.1.1.	Analyse des Gasprofils mit Medium ohne Zugabe von Zellen	40
4.1.2.	Charakterisierung von <i>W. succinogenes</i> Wildstamm, <i>W. succinogenes</i> komp <sub>p<sub>nos</sub></sub> <i>nosZ</i> und <i>W. succinogenes</i> Δ <i>nosZ</i> in Nitrat-reichen Medien	43
4.1.3.	Charakterisierung von <i>W. succinogenes</i> Wildstamm, <i>W. succinogenes</i> komp <sub>p<sub>nos</sub></sub> <i>nosZ</i> und <i>W. succinogenes</i> Δ <i>nosZ</i> in Nitrat-limitiertem Medium	49
4.1.4.	Reduktion von externem N <sub>2</sub> O	52
4.1.5.	Inhibierung der N <sub>2</sub> O-Reduktase mittels Acetylen	54
4.1.6.	Charakterisierung von <i>W. succinogenes</i> Δ <i>nrfHA</i> , <i>W. succinogenes</i> Δ <i>fdp</i> und <i>W. succinogenes</i> Δ <i>fdp</i> Δ <i>nrfHA</i>	56
4.2.	<b>Untersuchung des Wachstums durch N<sub>2</sub>O-Atmung</b>	60
4.3.	<b>Ermittlung einer möglichen Toxizität von N<sub>2</sub>O auf <i>W. succinogenes</i></b>	61
4.4.	<b>Die N<sub>2</sub>O-Reduktase cNosZ</b>	62
4.4.1.	Konstruktion und Charakterisierung von <i>W. succinogenes</i> komp <sub>p<sub>nos</sub></sub> <i>nosZ</i> Tat	62
4.4.2.	Bestimmung der Elektronentransportaktivität Formiat → N <sub>2</sub> O	65
4.4.3.	Bestimmung der cNosZ Aktivität mittels artifizieller Elektronendonoren	66
4.5.	<b>Die Monohäm Cytochrome cNosC1 und NosC2</b>	68
4.5.1.	Homologe Produktion von NosC1 und NosC2 im <i>nos</i> -Locus	70
4.5.2.	Homologe Produktion von NosC1 und NosC2 im <i>nrf</i> -Locus	72
4.5.3.	Heterologe Produktion von NosC1 und NosC2 in <i>Escherichia coli</i>	74
4.6.	<b>NosB</b>	81
4.6.1.	Heterologe Produktion von NosB in <i>Escherichia coli</i>	81
4.6.2.	Lokalisierung von NosB	84
5.	<b>DISKUSSION</b>	85
5.1.	<b>Produktion und Verbrauch von NO in Nitrat-ammonifizierenden Bakterien</b>	85
5.2.	<b>Typische und atypische N<sub>2</sub>O-Reduktasen</b>	88
5.3.	<b>Wachstum von <i>W. succinogenes</i> durch N<sub>2</sub>O-Atmung</b>	93
5.4.	<b>Vergleich der Gasprofile von <i>W. succinogenes</i> mit <i>P. denitrificans</i></b>	95
5.5.	<b>Hypothetische Elektronentransferwege zu cNosZ in <i>W. succinogenes</i></b>	96
6.	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	102
7.	<b>ANHANG</b>	111
7.1.	<b>Alignments</b>	111
7.2.	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	120

---

7.3. Publikationen	122
7.4. Lebenslauf	123
7.5. Ehrenwörtliche Erklärung	124
8. DANKSAGUNG	125

---

## 1. Zusammenfassung

---

Distickstoffmonoxid ( $\text{N}_2\text{O}$ ) ist neben Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ) und Methan ( $\text{CH}_4$ ) eines der wichtigsten Treibhausgase, dessen Konzentration in der Atmosphäre seit dem Beginn der Industrialisierung kontinuierlich ansteigt. Bereits heute wird  $\text{N}_2\text{O}$  für 9% des anthropogenen Treibhauseffektes verantwortlich gemacht. Auf Grund von verbesserten Produktionstechniken und einem gestiegenen Umweltbewusstsein sind die abiotischen Emissionen von  $\text{N}_2\text{O}$  in den letzten Jahren gesunken. Im Vergleich dazu steigen jedoch die biotischen Emissionen aus Böden, Seen und Ozeanen, in denen  $\text{N}_2\text{O}$  hauptsächlich von Mikroorganismen produziert und freigesetzt wird. Der geschätzte Anteil an der Gesamtbilanz liegt heute bei 70% mit steigender Tendenz für die Zukunft, bedingt durch die steigende Düngung von Agraflächen.

Im Prozess der Denitrifikation kann Nitrit über Intermediate unter anaeroben Bedingungen zu Stickstoff reduziert werden. Dabei wird sowohl  $\text{N}_2\text{O}$  durch respiratorische Stickstoffmonoxid-Reduktasen produziert als auch durch die Distickstoffmonoxid-Reduktase ( $\text{N}_2\text{OR}$ ) zu Stickstoff wieder reduziert. Die  $\text{N}_2\text{OR}$  ist das einzige bekannte Enzym, welches die Reduktion von Distickstoffmonoxid ( $\text{N}_2\text{O}$ ) zu Stickstoff ( $\text{N}_2$ ) katalysiert. Die Einzigartigkeit der  $\text{N}_2\text{O}$ -Reduktase führte zu einem umfangreichen Wissen über den Prozess der Denitrifikation an sich sowie über den Verlauf und die Regulation der  $\text{N}_2\text{O}$ -Atmung in Denitrifizierern wie *Paracoccus denitrificans*. Im Kontrast zu diesem Organismus steht *Wolinella succinogenes*, ein Modellorganismus für die Nitrat-Ammonifikation. Dieses Bakterium besitzt keine respiratorischen NO-produzierenden Nitritreduktasen oder NO-Reduktasen wie sie typischerweise in Denitrifizierern zu finden sind. Trotzdem kodiert *W. succinogenes* für eine  $\text{N}_2\text{O}$ -Reduktase, welche C-terminal eine Monohäm Cytochrome c-Domäne besitzt (cNosZ). Die  $\text{N}_2\text{OR}$  von Denitrifizierern hat keine solche Domäne, weshalb die Reduktase als typisch bezeichnet wird. Trotz dieses Unterschiedes konnte für das gereinigte Enzym aus *W. succinogenes* eine Enzymaktivität, die mit der von *P. denitrificans* vergleichbar ist, ermittelt werden. Der  $\text{N}_2\text{O}$ -Metabolismus in wachsenden Nitrat-ammonifizierenden *W. succinogenes* Kulturen wurde bislang aber nicht untersucht.

Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung der  $\text{N}_2\text{O}$ -Reduktionsrate in Nitrat-ammonifizierenden *W. succinogenes* Kulturen. *W. succinogenes* Wildstamm besitzt im  $\text{N}_2\text{OR}$  kodierendem Gen (*nosZ*) ein Insertionselement, welches das *nosZ*-Gen unterbricht. In der entsprechenden Deletionsmutante *W. succinogenes*  $\Delta\text{nosZ}$  wurde das ganze *nosZ*-Gen entfernt. Der Stamm *W. succinogenes*  $\text{komp}_{\text{p}_{\text{nos}}}\text{nosZ}$  hingegen verfügt über ein intaktes *nosZ*-Gen ohne Insertionselement. In Kulturen mit Zellen dieser drei Stämme wurden die Gase NO,  $\text{N}_2\text{O}$  und  $\text{N}_2$  in der Gasphase bestimmt. Bezüglich des Wachstums, des Nitrat- und des Nitritumsatzes wurden keine phänotypischen Unterschiede detektiert, jedoch zeigte die Analyse der

---

Gasprofile eine Akkumulation von N<sub>2</sub>O in den Kulturen mit *W. succinogenes* Wildstamm und *W. succinogenes* Δ*nosZ*. Im Vergleich dazu akkumulierte jedoch in Kulturen mit *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>*nosZ* kein N<sub>2</sub>O sondern eine korrespondierende Menge an N<sub>2</sub>. Inhibierungsexperimente mit Acetylen bestätigten die N<sub>2</sub>O-Reduktase als Quelle für den detektierten molekularen Stickstoff. Solange Nitrat über Nitrit zu Ammonium reduziert wird, sind Zellen von *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>*nosZ* in der Lage sowohl intern produziertes als auch extern hinzugefügtes N<sub>2</sub>O zu reduzieren. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass das Verhältnis von dem Elektronendonator (Formiat) zu dem Elektronenakzeptor (Nitrat) keinen Einfluss auf die N<sub>2</sub>O-Reduktionsrate von *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>*nosZ* hat.

Obwohl *W. succinogenes* über keine respiratorischen NO-produzierenden Nitritreduktasen verfügt, wurde in allen Kulturen NO detektiert. Experimente mit Medium ohne Zellen zeigten eine chemische Dekomposition von Nitrit mit dem Medium-Zusatz Brain-Heart Infusion auf. Als NO-detoxifizierende Proteine wurden ein cytoplasmatisches Flavodieisenprotein (Fdp) sowie die periplasmatische Cytochrom c Nitritreduktase (NrfA) vermutet. Ihre Beteiligung an der Abwehr von nitrosativem Stress konnte bereits in anderen Arbeiten nachgewiesen werden, jedoch erfolgte keine experimentelle Identifikation der Produkte. Die Analyse der Gasprofile zeigte erhöhte Konzentrationen an NO und N<sub>2</sub>O in den Kulturen der *W. succinogenes* Einfach- und Doppelmутanten von *nrfHA* und *fdp* im Vergleich zu *W. succinogenes* Wildstamm auf. Dies spricht für das Vorhandensein eines zusätzlichen NO-detoxifizierenden Proteins in *W. succinogenes*.

Bioinformatische Analysen aller verfügbaren c*NosZ* Sequenzen führten insgesamt zur Identifikation von 20 weiteren bakteriellen *nos*-Genclustern, welche für eine atypische N<sub>2</sub>O-Reduktase wie in *W. succinogenes* kodieren. Dabei gehören nicht alle entsprechenden Arten der Klasse der Epsilonproteobacteria an. Ein Vergleich der dazugehörigen *nos*-Gencluster zeigte eine einheitliche Anzahl und Reihenfolge der Gene in den untersuchten Bakterienarten auf. Auf Grund der Präsenz von Protein-kodierenden Genen, welche in den *nos*-Genclustern von Denitrifizierern nicht vorhanden sind, wird eine Beteiligung dieser putativen Proteine am Elektronentransfer vom Menachinol-Pool zur terminalen N<sub>2</sub>OR vermutet. Zur Verifizierung der hypothetischen Funktion sollten die putativen Elektronenüberträgerproteine NosC1, NosC2 und NosB produziert werden. Das möglicherweise transmembrane Protein NosB ließ sich bislang heterolog in *Escherichia coli* produzieren und kann in folgenden Arbeiten zur Anwendung kommen. Insgesamt lässt sich sagen, dass das Nitrat-ammonifizierende Bakterium *W. succinogenes* in der Lage ist sowohl N<sub>2</sub>O zu produzieren als auch zu reduzieren.

---

## 2. Einleitung

---

### 2.1. Distickstoffmonoxid

Im Januar 2014 veröffentlichte die Heinrich-Böll-Stiftung in Zusammenarbeit mit dem Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland ein Essay mit Daten und Fakten zur globalen Fleischproduktion (Fleischatlas, 2014). Danach werden heute bereits 70% aller Agrarflächen für die Produktion von Fleisch beansprucht, wobei die steigende Nachfrage nach Fleisch in Schwellenländern wie China und Brasilien noch nicht mit berücksichtigt ist. Daher ist in den kommenden Jahren eine zusätzliche Erhöhung der Agrarproduktion zu erwarten. Bedenkt man die limitierte Fläche, welche sich für den Anbau eignet, ist der vermehrte Einsatz von Dünger eine mögliche Option zur Produktionssteigerung. Durch das Haber-Bosch-Verfahren kann bereits seit fast einem Jahrhundert Stickstoff-haltiger Dünger im industriellen Maßstab für die Landwirtschaft bereitgestellt werden. Dies trug und trägt im Wesentlichen zur Ernährung der Weltbevölkerung bei. Ein Nachteil der Düngung mit Stickstoffverbindungen ist jedoch die Freisetzung von Distickstoffmonoxid ( $\text{N}_2\text{O}$ ) aus den gedüngten Agrarflächen. Dieses inerte Gas ist nach Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ) und Methan ( $\text{CH}_4$ ) eines der wichtigsten Treibhausgase und zudem in der Lage, Ozon in der Stratosphäre zu zerstören (Ravishankara *et al.*, 2009). Seit dem Beginn der Industrialisierung steigen die Konzentrationen der genannten Treibhausgase durch den Verbrauch fossiler Brennstoffe sowie durch die landwirtschaftliche Nutzung (Canfield *et al.*, 2010; IPCC, 2007; Lassey & Harvey, 2007). Anhand von Eiskernbohrungen konnte ein anfänglicher Wert von 270 ppb  $\text{N}_2\text{O}$  in der Atmosphäre ermittelt werden, der seit dem Jahre 1750 stetig steigt und im Jahre 2005 bereits bei 319 ppb lag (IPCC, 2007). Auch wenn die Konzentration im Vergleich zu dem viel diskutierten Treibhausgas  $\text{CO}_2$  mit 379 ppm (Stand 2005) vergleichsweise niedrig ist, darf die Relevanz von  $\text{N}_2\text{O}$  am anthropogenen Treibhauseffekt nicht unterschätzt werden. Auf Grund einer mittleren atmosphärischen Verweildauer von 114 Jahren und einem 310-fach höheren Treibhauspotential als  $\text{CO}_2$  ist  $\text{N}_2\text{O}$  bereits heute für etwa 9% des anthropogenen Treibhauseffektes verantwortlich (Ravishankara *et al.*, 2009). Einen Anteil daran haben  $\text{N}_2\text{O}$  freisetzende Prozesse wie beispielsweise die Adipinsäuresynthese in der chemischen Industrie sowie die Verwendung von  $\text{N}_2\text{O}$  als Treibgas in Lebensmitteln. Auf Grund eines gestiegenen Umweltbewusstseins und verbesserter Produktionstechniken verringerte sich dieser abiotische Anteil an der gesamten  $\text{N}_2\text{O}$ -Emissionsbilanz signifikant in den letzten 15 Jahren (Thomson *et al.*, 2012). Im Gegensatz dazu steigt jedoch die weltweite biotische Emission aus Böden, Seen und Ozeanen, welche natürliche Quellen des klimarelevanten  $\text{N}_2\text{O}$  sind (Canfield *et al.*, 2010; Hoehne, 2008; Ruser, 2001; Stehfest & Bouwman, 2006). Das emittierte  $\text{N}_2\text{O}$  stammt hauptsächlich von Organismen, deren  $\text{N}_2\text{O}$ -Freisetzung durch die landwirtschaftliche Nutzung

und die Bereitstellung von Nitrat-haltigem Dünger gesteigert wird (Bakken *et al.*, 2012; Felgate *et al.*, 2012; Richardson *et al.*, 2009).

In der dissimilatorischen Nitratreduktion wird das Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) zu Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) reduziert, welches in 3 verschiedenen anaeroben Stoffwechselwegen als Elektronenakzeptor verwendet wird (Abb. 1). Ammonifizierer reduzieren dieses ohne freiwerdende Intermediate zu Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), welches für die Synthese von organischen Stickstoffverbindungen benötigt wird. In der Anammox-Reaktion wird das Nitrit in Verbindung mit Ammonium zu molekularem Stickstoff ( $\text{N}_2$ ) reduziert, während es in der Denitrifikation in Abhängigkeit der enzymatischen Ausstattung über gasförmige Intermediate ( $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ) reduziert werden kann. Stickstoff ist ein inertes Gas mit einem atmosphärischen Anteil von 78%. Es kann lediglich durch die Stickstofffixierung (Nitrogenase abhängige Reduktion zu Ammonium) dem Kreislauf wieder hinzugefügt werden (Abb. 1). Das dadurch entstehende Ammonium kann durch die Nitrifikation wieder zu Nitrat oxidiert werden. Durch das Einbringen von zusätzlichem Nitrat über Düngung steigt die  $\text{N}_2\text{O}$ -Emission, da Nitrat als Elektronakzeptor in der Denitrifikation bevorzugt wird (Richardson *et al.*, 2009). Aber auch andere Faktoren wie der pH-Wert, die Temperatur, der Feuchtigkeitsgehalt des Bodens und die Verfügbarkeit an Kupfer beeinflussen die Menge an freigesetztem  $\text{N}_2\text{O}$  (Bergaust *et al.*, 2010; Hoehne, 2008; Liu *et al.*, 2010; Sullivan *et al.*, 2013).

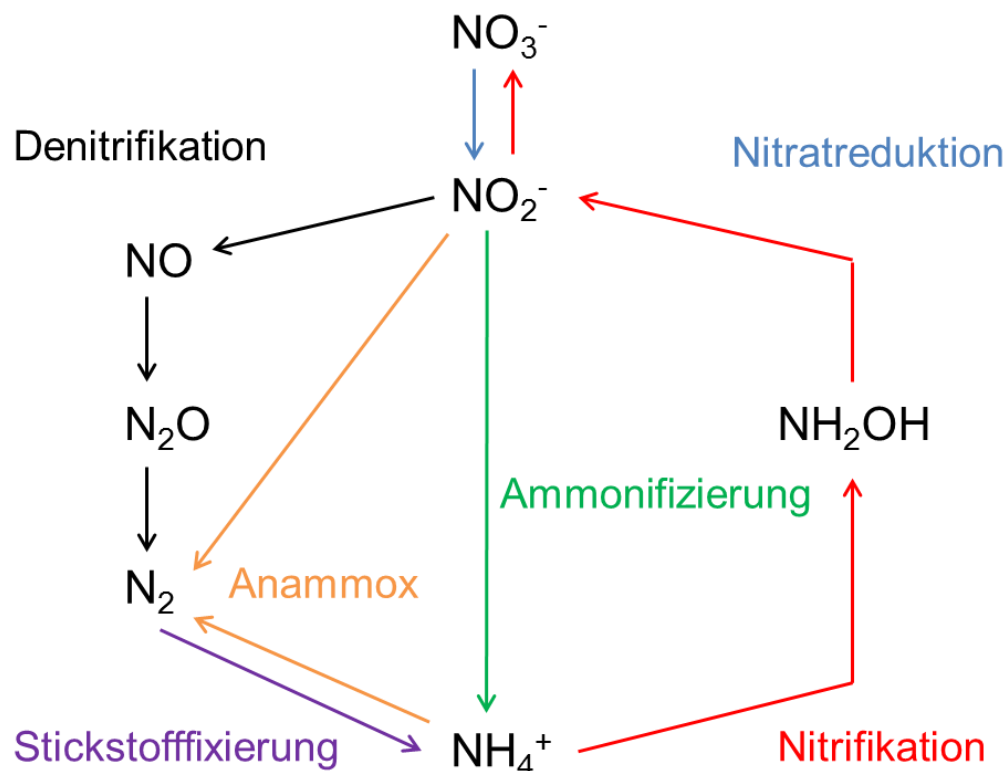


Abb. 1: Biogeochemischer Stickstoffkreislauf nach Richardson *et al.*, 2009

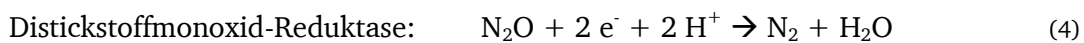
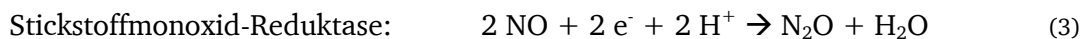
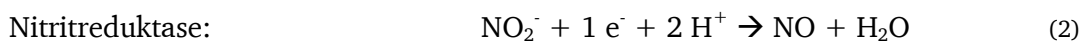
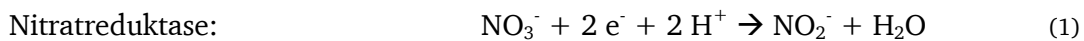


---

## 2.2. Denitrifikation

Die Denitrifikation ist ein Prozess der anaeroben Atmung, in welchem Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) schrittweise zu Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ), Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}$ ), Distickstoffmonoxid ( $\text{N}_2\text{O}$ ) und Stickstoff ( $\text{N}_2$ ) reduziert wird. Neben dem Anammox-Prozess ist es der einzige bislang bekannte Stoffwechselweg, in dem gebundener Stickstoff zu molekularem Stickstoff umgewandelt wird (Abb. 1).  $\text{N}_2$  ist ein inertes Gas, welches hauptsächlich in die Atmosphäre entweicht.

Im Denitrifikationsprozess wird Nitrat als Elektronenakzeptor verwendet. Als Elektronendonator kann sowohl eine organische Verbindung wie beispielsweise Succinat als auch eine anorganische Verbindung wie beispielsweise molekularer Wasserstoff dienen. Der Prozess der Denitrifikation ist in Bakterien weit verbreitet (zum Beispiel in Alpha-, Beta- und Gammaproteobakterien) und kann auch von Archaeen und Pilzen durchgeführt werden (Zumft, 1997). Eine Übersicht bezüglich der einzelnen Schlüsselenzyme sowie der dazugehörigen Reaktion ist in den Gleichungen 1 bis 4 dargestellt.



Die Anzahl und der Typ der beteiligten Reduktasen variieren innerhalb der Denitrifizierer jedoch. So existieren zwei verschiedene Nitratreduktase-Typen; die Membran-gebundene Nitratreduktase (Nar) und die periplasmatische Nitratreduktase (Nap). Die Membran-gebundene Nitratreduktase ist ein Heterotrimer, bestehend aus den beiden Proteinen NarG und NarH. Dieser Komplex wird durch ein weiteres Protein mit der Membran verbunden. Bei *Paracoccus denitrificans* ist dieses Protein das membran-gebundene Häm *b*-haltige NarI (Abb. 2 A). Das entstehende Nitrit wird über einen Nitrat/Nitrit Antiporter ins Periplasma transportiert (Cartron *et al.*, 2002; Gates *et al.*, 2011). Die periplasmatische Nitratreduktase ist im Allgemeinen ein Heterodimer, welches sich aus dem NapA-Protein und dem Cytochrom *c*-haltigem NapB-Protein zusammensetzt. Dieser lösliche Komplex interagiert in *Paracoccus denitrificans* mit dem Membran-gebundenen NapC (Abb. 2 B). NapC ist eine Chinol-Dehydrogenase, ebenso wie der Membran-gebundene NapGH-Komplex, mit welchem der lösliche NapAB Nitratreduktase-Komplex ebenfalls interagieren kann (Simon & Klotz, 2013). Für die Reduktion des entstandenen Nitrits zu Stickstoffmonoxid sind zwei Reduktase-Typen bei Denitrifizieren bekannt; die Kupfer-abhängige Nitritreduktase (NirK) und die Cytochrom *cd*<sub>1</sub>-abhängige Nitritreduktase (NirS). Beide Reduktasen sind periplasmatisch lokalisiert und

---

erhalten die für die Reduktion von Nitrit benötigten Elektronen von löslichen Proteinen u.a. Pseudoazurin und Monohäm Cytochromen *c* (Simon & Klotz, 2013). In *P. denitrificans* erfolgt der Elektronentransfer vermutlich vom Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplex über das Tetrahäm Cytochrom *c* NirM zur terminalen Reduktase (Abb. 2 C; Saunders *et al.*, 1999; Zumft, 1997). Für die weitere Reduktion des entstandenen NO zu N<sub>2</sub>O existiert eine Vielzahl an Reduktasen (cNor, qNor, Cu<sub>A</sub>-qNor, sNor, eNor, gNor). Besonders gut charakterisiert ist cNor aus *Paracoccus denitrificans* (Watmough *et al.*, 2009). Der Membran-ständige heterodimere cNor-Komplex besteht aus dem Häm *c*-haltigem NorC und dem Häm *b*-haltigem NorB (Abb. 2 D). Das katalytische Zentrum der cNor-Reduktase befindet sich auf der periplasmatischen Seite. Die für die Reduktion von NO zu N<sub>2</sub>O benötigten Elektronen werden von kleinen löslichen, periplasmatischen Proteinen wie beispielsweise dem Cytochrom *c*<sub>550</sub> auf den Proteinkomplex NorBC transferiert. Das entstehende N<sub>2</sub>O wird durch die N<sub>2</sub>O-Reduktase (N<sub>2</sub>OR) zu molekularem Stickstoff reduziert (Watmough *et al.*, 2009). Zum jetzigen Zeitpunkt ist lediglich ein Typ dieser Reduktase bei denitrifizierenden Organismen bekannt, die im folgenden Kapitel beschrieben wird (Abb. 2 D; Richardson *et al.*, 2009; Simon & Klotz, 2013). In Abhängigkeit von der enzymatischen Ausstattung eines Denitrifizierers und den vorliegenden Bedingungen des Habitates (beispielsweise Nitrat- und Nitritkonzentration) ist eine vollständige Reduktion des Nitrates zu molekularem Stickstoff möglich (Bergaust *et al.*, 2010; Felgate *et al.*, 2012; Kampschreur *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2010; Nadeem *et al.*, 2012). Umweltrelevant ist jedoch der zunehmende Anteil an unvollständiger Denitrifikation, die meist mit der Freisetzung des klimarelevanten Gases N<sub>2</sub>O endet (Richardson *et al.*, 2009).

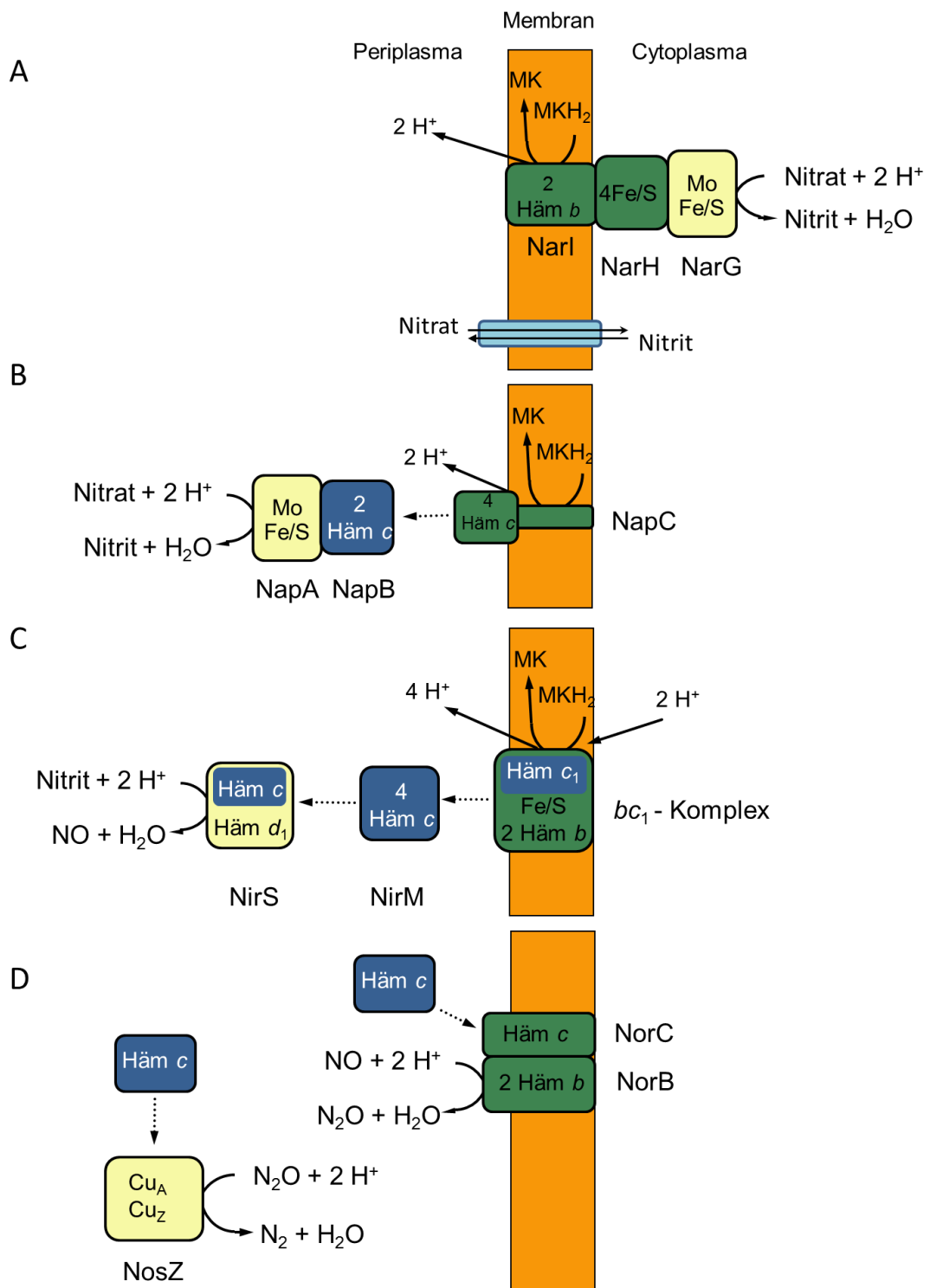


Abb. 2: Schematische Darstellung der putativen Elektronentransferwege vom Menachinol ( $\text{MKH}_2$ ) zur terminalen Reduktase (in gelb dargestellt) in *Paracoccus denitrificans*. Membran-gebundene Chinol-Dehydrogenasen sind in grün dargestellt. Die schwarzen gestrichelten Pfeile markieren putative Elektronentransferwege. Lösliche Cytochrome c sind in blau dargestellt (verändert nach Simon & Klotz, 2013).

### 2.2.1. N<sub>2</sub>O-Reduktase

Die N<sub>2</sub>O-Reduktase wird in Denitrifizieren durch das Gen *nosZ* kodiert und als typische N<sub>2</sub>O-Reduktase bezeichnet. Es ist ein periplasmatisches Kupfer-haltiges Enzym und besteht aus zwei Domänen, welche jeweils ein Cu-Zentrum besitzen. Die C-terminale Domäne beinhaltet das Cu<sub>A</sub>-Zentrum, welches aus zwei Schwefel- und zwei Kupfer-Atomen aufgebaut ist. Die N-terminale Domäne beinhaltet das Cu<sub>Z</sub>-Zentrum und besteht aus vier Kupfer-Atomen, welche durch ein Schwefel-Atom untereinander verbunden sind. Die für die Reduktion des inerten Gases N<sub>2</sub>O benötigten Elektronen gelangen über das Cu<sub>A</sub>-Zentrum zum Cu<sub>Z</sub>-Zentrum. Da die Distanz der beiden Zentren innerhalb eines Proteins mit etwa 40 Å für eine effiziente Weiterleitung von Elektronen zu groß ist, liegen jeweils zwei Proteine (Monomere) in einer „head-to-tail“ Formation vor (Abb. 3). Dies verringert die Distanz zwischen den Zentren der Monomere auf ungefähr 10 Å (Dell’Acqua *et al.*, 2011a; Haltia *et al.*, 2003; Pomowski *et al.*, 2011; Wüst *et al.*, 2012).

Gereinigtes NosZ kann in verschiedenen Redox-Formen vorliegen, abhängig von den Bedingungen der Isolation (Dell’Acqua *et al.*, 2012; Ertem *et al.*, 2012). In Abwesenheit von Sauerstoff besitzt die Reduktase eine sogenannte „purple“-Form, bei der beide Kupfer-Zentren oxidiert vorliegen. Bei einer Isolierung unter aeroben Bedingungen liegt die Reduktase in der sogenannten „pink“-Form vor, in welcher ebenfalls das Cu<sub>A</sub>-Zentrum oxidiert ist. Das Cu<sub>Z</sub>-Zentrum hingegen weist ein anderes Spektrum bei der Elektronenspinresonanzmessung auf als in der „purple“-Form und wird deshalb als Cu<sub>Z</sub>\* bezeichnet. Unabhängig von der ursprünglich isolierten Form muss für eine Messung der spezifischen Enzymaktivität der N<sub>2</sub>O-Reduktase zunächst eine vollständige Reduzierung des Cu<sub>Z</sub>-Zentrums erfolgen (Dell’Acqua *et al.*, 2011a).



Abb. 3: Kristallstruktur der homodimeren N<sub>2</sub>O-Reduktase von *Paracoccus denitrificans* in der „head-to-tail“ Formation (Zumft & Kroneck, 2007)

---

### 2.2.2. Das *nos*-Gencluster

Die N<sub>2</sub>O-Reduktase wird im *nos*-Gencluster kodiert, dessen Umfang unter Denitrifizieren variieren kann. In *Pseudomonas stutzeri* beinhaltet das Gencluster die 6 offenen Leserahmen *nosR-Z-D-F-Y-L* (Abb. 4; Cuypers *et al.*, 1995; Vollack & Zumft, 2001). In *Paracoccus denitrificans* hingegen besteht das Gencluster aus den 7 offenen Leserahmen *nosR-Z-D-F-Y-L-X* (Saunders *et al.*, 2000; Zumft, 2005). Das durch *nosR* kodierte integrale Membranprotein besitzt vermutlich sechs transmembrane Helices. Am C-Terminus liegt eine cytoplasmatische Domäne, deren Struktur ähnlich zu NapH von *Escherichia coli* ist (Wunsch & Zumft, 2005). Des Weiteren konnte eine Flavinmononukleotid-Bindedomäne identifiziert werden (van Spanning, 2011). Die Deletion dieser Domäne resultierte in einem Fehlen der N<sub>2</sub>O-Reduktaseaktivität der Zellen, obwohl ein katalytisch aktives Enzym gebildet wurde. Dies konnte mittels *in vitro* durchgeführten Enzymassays mit gereinigter N<sub>2</sub>O-Reduktase und reduziertem Benzylviologen als artifiziellen Elektronendonator nachgewiesen werden (Velasco *et al.*, 2004; Wunsch & Zumft, 2005). Hingegen führt die Deletion des gesamten *nosR*-Genes zum Verlust des *nosZ*-Transkriptes und beendet damit den Denitrifikationsprozess mit der Freisetzung von N<sub>2</sub>O (Wunsch & Zumft, 2005). Basierend auf diesen Daten wird angenommen, dass NosR eine Doppelfunktion in der N<sub>2</sub>O-Respiration zukommt. Zum einen fungiert das Protein als Regulator und ist essentiell für die Transkription von *nosZ*, zum anderen ist es im Elektronentransport zur Reduktase involviert. Ob die Weiterleitung direkt erfolgt oder Kupfer-haltige Proteine bzw. Cytochrome *c* als Mediatoren dienen, ist spekulativ (Dell'Acqua *et al.*, 2012; Fujita *et al.*, 2012). Die Proteine NosD, NosF und NosY bilden zusammen vermutlich einen ABC-Transporter, welchem eine Funktion im Zusammenbau des Cu<sub>Z</sub>-Zentrums der Reduktase zukommt. NosD ist ein periplasmatisches Protein, während NosY ein membrangebundenes Protein ist. Es wird vermutet, dass NosY mit dem cytoplasmatisch lokalisierten NosF interagiert, welches eine ATPase ist (Honisch & Zumft, 2003; Zumft *et al.*, 1990). Die Deletion eines der kodierenden Gene führt zu einem Fehlen des Cu<sub>Z</sub>-Zentrums in der N<sub>2</sub>O-Reduktase (Dooley *et al.*, 1991; Zumft *et al.*, 1990). Zusammen mit *nosDFY* wird auch *nosL* transkribiert. Dieses kodiert vermutlich für ein Kupfer-Chaperon, da eine spezifische Bindung von Kupfer(I) an gereinigtem NosL nachgewiesen wurde (Dreusch *et al.*, 1996; McGuirl *et al.*, 2001; Taubner *et al.*, 2006). Trotzdem scheint das Protein keine essentielle Rolle in der NosZ-Biogenese zu haben, da eine Deletion von *nosL* zu keinem veränderten Phenotyp führt (Dreusch *et al.*, 1996). NosX ist ein periplasmatisches Protein, das in vielen aber nicht allen *nos*-Genclustern vorkommt (Abb. 4; Zumft, 2005). Obwohl die Deletion des Gens zu einem Verlust der N<sub>2</sub>O-Reduktaseaktivität führt und das Protein demnach essentiell ist, ist über die genaue Funktion von NosX bislang nichts bekannt

(Saunders *et al.*, 2000). Es wird lediglich vermutet, dass NosX im Elektronentransport beteiligt ist (van Spanning, 2011; Wunsch *et al.*, 2005).

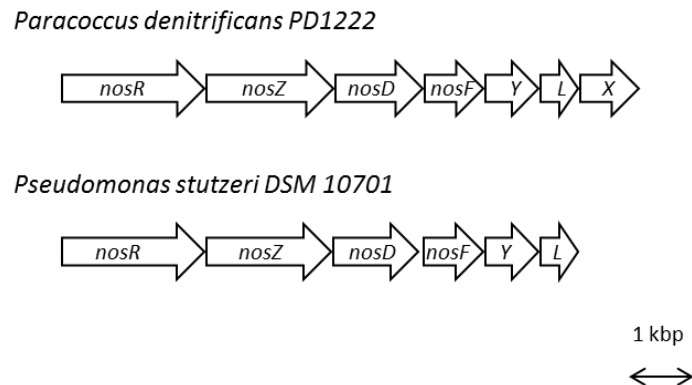


Abb. 4: Die *nos*-Gencluster von *Paracoccus denitrificans* und *Pseudomonas stutzeri*.

### 2.3. Respiratorische Nitrat-Ammonifikation

Die respiratorische Ammonifikation ist wie die Denitrifikation ein Prozess der anaeroben Atmung und wird in Abwesenheit von Sauerstoff durchgeführt. Als Elektronenakzeptor dient Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), welches schrittweise zu Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) und Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) reduziert wird. Im Gegensatz zur Denitrifikation entstehen hier keine gasförmigen Stickstoff-Verbindungen, welche entweichen und dem Ökosystem als Stickstoffquelle nicht mehr zur Verfügung stehen. Die verwendeten Elektronendonoren können sowohl organische Verbindungen wie beispielsweise Formiat als auch anorganische Verbindungen wie beispielsweise elementarer Wasserstoff sein. Vergleichbar zur Denitrifikation gibt es auch in der Ammonifikation mehrere respiratorische Reduktase-Typen. In Bezug auf die Nitratreduktasen sind es die bereits in Kapitel 2.2. beschriebene Membran-gebundene Nitratreduktase (Nar) und die periplasmatische Nitratreduktase (Nap). Das durch die Nitratreduktion gebildete Nitrit wird durch die periplasmatische Cytochrom c Nitritreduktase NrfA zu Ammonium umgesetzt. Diese Reduktase kann zum einen als lösliches periplasmatisches Protein vorliegen, das durch das Häm c-haltige NrfB und NrfCD mit den benötigten Elektronen aus dem Chinol-Pool versorgt wird. Zum anderen kann es mit der Membran-gebundenen Chinol-Dehydrogenase NrfH einen Komplex bilden (Simon, 2011).

Die enzymatische Ausstattung eines Ammonifizierers hinsichtlich der Nitratreduktasen kann variieren. So verfügt der Modelorganismus *Escherichia coli* sowohl über die Membran-gebundene als auch über die periplasmatische Nitratreduktase. Hingegen besitzt *Wolinella succinogenes* nur die periplasmatische Nitratreduktase.

### 2.3.1. *Wolinella succinogenes*

*Wolinella succinogenes* ist ein Gram-negatives Bakterium, welches der Klasse der Epsilonproteobacteria zugeordnet wird und erstmals 1961 durch Wolin beschrieben wurde (Wolin *et al.*, 1961). Die Isolation erfolgte aus dem Pansen von Rindern, wo es kommensalisch vorkommt. Im Vergleich zu anderen Vertretern der Ordnung Campylobacterales ist *W. succinogenes* weder tier- noch humanpathogen und lässt sich in definierten Medien leicht vermehren. *W. succinogenes* ist sowohl anaerob als auch mikroaerob kultivierbar unter Verwendung von Formiat, Wasserstoff oder Sulfid als Elektronendonator. Als Elektronenakzeptoren können verschiedene Substrate dienen, zum Beispiel Fumarat, Nitrat, Nitrit, Sulfit und Polysulfid (Bokranz *et al.*, 1983; Hedderich *et al.*, 1999; Kern *et al.*, 2011a; Kröger *et al.*, 2002; Lorenz *et al.*, 1993).

Für die Nitrat-Ammonifikation stehen *W. succinogenes* zwei terminale Reduktasen zur Verfügung (Abb. 5); zum einen die periplasmatische Nitratreduktase (NapA) und zum anderen die periplasmatische Cytochrom c Nitritreduktase (NrfA).

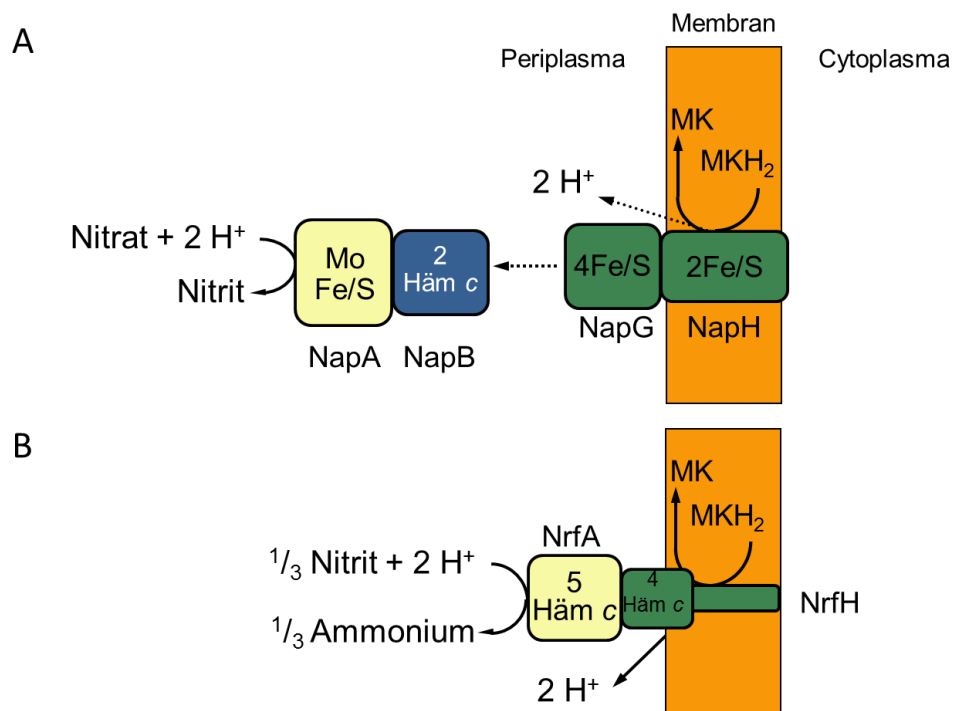
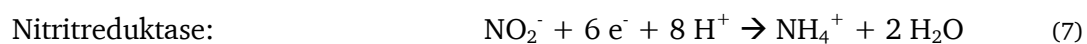
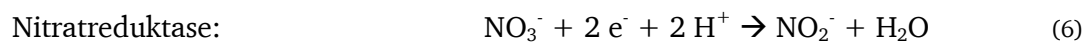
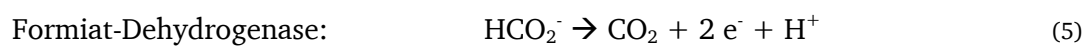


Abb. 5: A: Periplasmatisches Nitratreduktase-System; B: Cytochrom c-Nitritreduktase-Komplex von *W. succinogenes*. MK: Menachinon, MKH<sub>2</sub>: Menachinol; Quelle: Verändert nach Kern & Simon, 2009

Die Nitratreduktase wird durch das erste Gen im *napAGHBFLD*-Gencluster kodiert (Kern & Simon, 2009). Die durch *napGH* kodierten Proteine vermitteln den Elektronentransport vom Menachinol zum löslichen NapAB-Komplex, welcher die Reduktion von Nitrat zu Nitrit

katalysiert (Abb. 5 A; Kern & Simon, 2008). Bei der Nitritreduktion wird der Elektronentransport vom Menachinol zur terminalen Reduktase durch das Membran-ständige Protein NrfH vermittelt, welches mit NrfA einen Komplex bildet (Abb. 5 B; Simon *et al.*, 2000). Für die vollständige Reduktion von einem Molekül Nitrat zu Ammonium werden acht Elektronen benötigt, welche durch die Oxidation von vier Molekülen Formiat geliefert werden (Gleichungen 5 bis 7). Die Deletion des für die terminale Reduktase kodierenden Gens *napA* bzw. *nrfA* resultiert in der Unfähigkeit des entsprechenden *W. succinogenes* Stammes durch Nitrat- bzw. Nitritatmung zu wachsen (Kern & Simon, 2009). Damit konnte experimentell bestätigt werden, dass *W. succinogenes* im Gegensatz zum Modellorganismus *E. coli* lediglich jeweils eine Nitrat- und Nitritreduktase besitzt.



Neben der Funktion als terminale Reduktase wurde dem NrfHA-Komplex auch eine Rolle in der Abwehr von reaktiven Stickstoff-Sauerstoff Spezies, wie zum Beispiel NO, zugewiesen (Kern *et al.*, 2011b). Zellen der entsprechenden Deletionsmutante *W. succinogenes*  $\Delta$ *nrfHA* wiesen in Hemmhoftests mit NO-generierenden Substanzen einen größeren Radius des Hemmhofes im Vergleich zum Wildstamm auf (Kern *et al.*, 2011b). Auch einem Dieisenflavoprotein (Fdp), welches durch das Gen *WS0163* kodiert wird, konnte durch diesen Test mittels einer entsprechenden Deletionsmutante eine Beteiligung an der NO-Stressabwehr zugewiesen werden. Das oder die entstehenden Produkte der NO-Detoxifikation durch diese beiden Proteine wurden für *W. succinogenes* bislang nicht identifiziert. Mit gereinigtem Fdp-Protein aus *Thermotoga maritima* konnte jedoch die Reduktion von NO zu N<sub>2</sub>O nachgewiesen werden (Hayashi *et al.*, 2010). Für NrfA aus *Sulfurospirillum deleyianum* konnte die Reduktion von NO zu NH<sub>4</sub><sup>+</sup> gezeigt werden (Stach *et al.*, 2000).

### 2.3.2. $\alpha$ NosZ-Reduktase aus *W. succinogenes*

Bemerkenswert für *W. succinogenes* ist das Vorhandensein einer weiteren terminalen Reduktase, der Distickstoffmonoxid-Reduktase. Obwohl *W. succinogenes* kein Denitrifizierer ist und auch über keine bisher bekannten respiratorischen NO-Reduktasen verfügt (vergleiche Kapitel 2.2.), ist es in der Lage N<sub>2</sub>O zu reduzieren (Teraguchi & Hollocher, 1989). In Anbetracht der steigenden Emissionsraten von N<sub>2</sub>O ist ein Organismus, der N<sub>2</sub>O reduziert aber vermutlich nicht produziert, von besonderem Interesse. Bereits in den späten 1980er Jahren wurde diese Reduktase aus *W. succinogenes* isoliert (Teraguchi & Hollocher, 1989). Im



---

Gegensatz zu den bekannten N<sub>2</sub>O-Reduktasen aus Denitrifizieren zeigte sich, dass die N<sub>2</sub>O-Reduktase aus *W. succinogenes* einen Cytochrom *c*-Anteil enthält. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der N<sub>2</sub>O-Reduktase erfolgte mit reduziertem Benzylviologen als artifiziell Elektronendonator und N<sub>2</sub>O als Substrat. Am gereinigten NosZ Enzym aus *W. succinogenes* konnte eine Aktivität von 160 μmol N<sub>2</sub>O min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> bestimmt werden (Teraguchi & Hollocher, 1989). Diese ist im Vergleich zur Aktivität des isolierten Enzyms von dem bekannten Denitrifizierer *Paracoccus denitrificans* mit 122 μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> um 30% höher (Snyder & Hollocher, 1986). Durch die Sequenzierung des Genoms von *W. succinogenes* im Jahr 2003 wurde die Präsenz des kodierenden Gens bestätigt (Abb. 6 A; Baar *et al.*, 2003). Ebenfalls bestätigt wurde der bereits identifizierte Cytochrom *c*-Anteil der Reduktase. Diese besitzt C-terminal eine Monohäm Cytochrom *c*-Domäne mit einem CXXCH Häm *c*-Bindemotiv (Simon *et al.*, 2004). Aufgrund dieser zusätzlichen Häm *c*-Gruppe wurde das Protein als cNosZ bezeichnet und im Vergleich zu den bekannten anderen NosZ-Proteinen als atypisch eingestuft. Vermutlich ist die Cytochrom *c*-Domäne am Elektronentransport von periplasmatischen, löslichen Cytochromen *c* zum katalytischen Zentrum der N<sub>2</sub>O-Reduktase beteiligt (Simon *et al.*, 2011). Des Weiteren wird anstelle eines Tat-Signalpeptides, wie es im Enzym bei Denitrifizieren zu finden ist, bei *W. succinogenes* für ein Sec-Signalpeptid im *nosZ*-Gen kodiert. Neben diesen Eigenschaften der atypischen N<sub>2</sub>O-Reduktase von *W. succinogenes* zeigte die Sequenzierung des Genoms noch eine Besonderheit auf. Im Strukturgen, welches für die Reduktase kodiert, befindet sich ein Insertionselement IS1302, wodurch das *nosZ* Gen unterbrochen und inaktiviert wird (Abb. 6 A; Simon *et al.*, 2004). Insgesamt wurden 13 Kopien dieses Insertionselementes im Genom identifiziert (Simon & Kröger, 1998). Auch wenn in der Veröffentlichung von Baar *et al.* eine Mischkultur nicht erwähnt wurde, konnten bei einer Amplifikation des *nosZ* Gens aus dem Wildstamm zwei DNA-Produkte beobachtet werden (Simon *et al.*, 2004). Das größere und dominantere DNA-Fragment war *nosZ* mit IS1302, welches im schwächeren und kleinerem DNA-Fragment fehlte (Simon *et al.*, 2004). Für die Charakterisierung der N<sub>2</sub>O-Atmung wurde deshalb der Stamm *W. succinogenes* p<sub>komp<sub>p<sub>nos</sub></sub></sub>*nosZ* erstellt (Abb. 6 C; Luckmann *et al.*, in Vorbereitung). Zunächst wurde *nosZ* durch die Konstruktion der Deletionsmutante Δ*nosZ* entfernt (Abb. 6 B). Auf Basis dieser Mutante wurde der Stamm *W. succinogenes* p<sub>komp<sub>p<sub>nos</sub></sub></sub>*nosZ* konstruiert, welcher über ein intaktes *nosZ*-Gen ohne Insertionselement verfügt (Abb. 6 C). Des Weiteren wurde ein zusätzlicher *nos*-Promotor stromabwärts der Kanamycingenkassette gesetzt. Dies sollte die Transkription aller nachfolgenden *nos*-Gene sicherstellen und polare Effekte vermeiden. Die Abwesenheit des Insertionselementes in *W. succinogenes* p<sub>komp<sub>p<sub>nos</sub></sub></sub>*nosZ* wurde

in regelmäßigen Abständen mittels PCR im Verlauf dieser Arbeit überprüft und bestätigte die genetische Stabilität des Stammes.

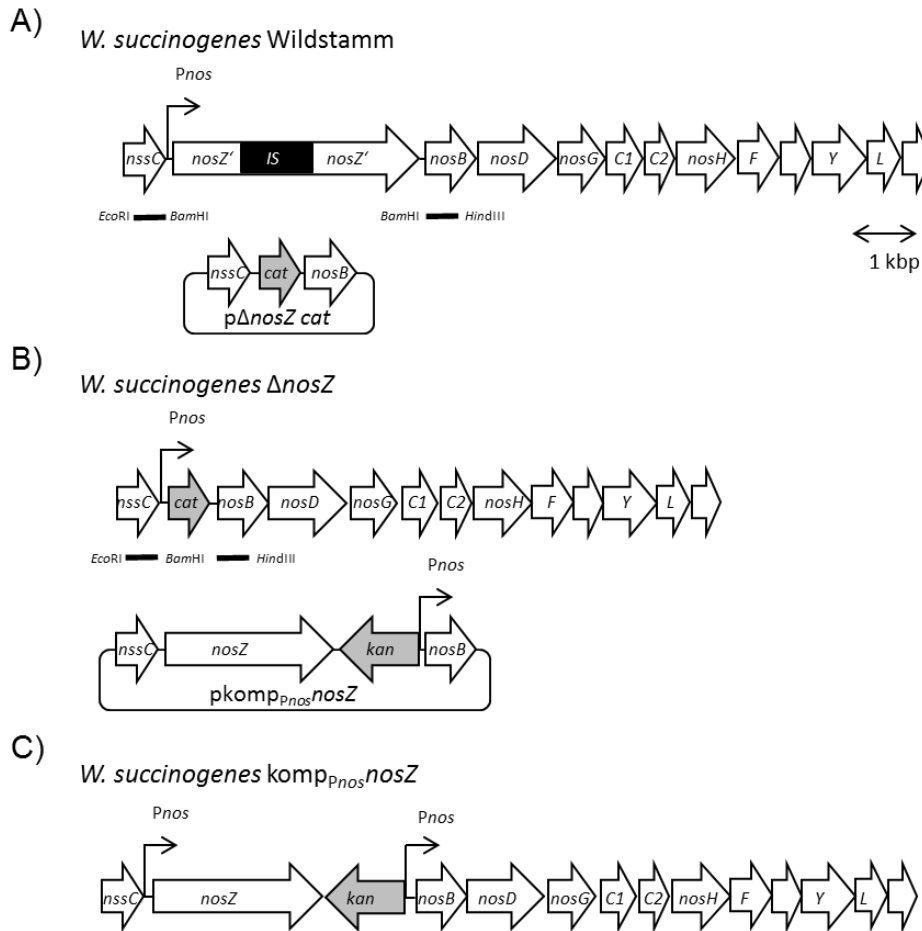


Abb. 6: Konstruktion von *W. succinogenes*  $\Delta$ *nosZ* und *W. succinogenes* komp<sub>Pnos</sub>*nosZ* mittels der Plasmide p $\Delta$ *nosZ cat* und pcomp<sub>Pnos</sub>*nosZ kan*. Rekombinationsbereiche sind durch schwarze Balken unter den Genclustern gekennzeichnet. Primer-vermittelte Restriktionsschnittstellen sind namentlich gekennzeichnet.

Im Vergleich zu den bekannten *nos*-Genclustern aus Denitrifizierern weist das von *W. succinogenes* ebenfalls Unterschiede auf. (Abb. 4, Abb. 6 A). So sind zum einen die Anzahl der offenen Leserahmen und zum anderen die darin kodierten Proteine atypisch. Insgesamt besteht das Gencluster aus 12 offenen Leserahmen. Der in typischen *nos*-Clustern als essentiell für die Aktivität betrachtete Regulator NosR fehlt, jedoch zeigen bioinformatische Sequenzvergleiche mittels BLAST von NosR aus *Pseudomonas stutzeri* und *Paracoccus denitrificans* einen ungefähr 250 Aminosäurereste umfassenden Bereich in diesen Proteinen auf, der mit NosH zu 25% identisch ist. Die anderen Gene *nosD*, *nosF*, *nosY* und *nosL*, welche für akzessorische Proteine kodieren, sind in beiden Gencluster-Varianten vorhanden. Jedoch ist ihre Anordnung im *nos*-Gencluster von *W. succinogenes* atypisch. Zwischen *nosD* und *nosF* wird für Homologe der NapGH Chinol-Dehydrogenase (*nosG*, *nosH*) sowie für zwei Monohäm

---

Cytochrome *c* (*nosC1*, *nosC2*) kodiert. Die genauen Funktionen der einzelnen Proteine sind noch unklar, es wird jedoch eine Beteiligung von NosG, NosC1, NosC2 und NosH am Elektronentransport vom Menachinol zur N<sub>2</sub>O-Reduktase vermutet (Sievert *et al.*, 2008; Simon *et al.*, 2004; siehe Kapitel 5.5.). Stromabwärts vom cNosZ-kodierenden Gen befindet sich das als *nosB* annotierte Gen (Abb. 6 A). Dies kodiert möglicherweise für ein transmembranes Protein, dessen Beteiligung am Elektronentransfer ebenfalls denkbar ist (van Spanning, 2011). Auch in anderen Epsilonproteobacteria, welche für ein *nosZ* kodieren, wurden diese Besonderheiten der N<sub>2</sub>O-Reduktase und der entsprechenden Gencluster identifiziert (Kern & Simon, 2009).

## 2.4. Ziel der Arbeit

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des N<sub>2</sub>O-Stoffwechsels in *Wolinella succinogenes*. Für die Untersuchung des N<sub>2</sub>O-Verbrauches sollten die Gaskomponenten Stickstoffmonoxid (NO), Distickstoffmonoxid (N<sub>2</sub>O) und Stickstoff (N<sub>2</sub>) in wachsenden Nitrat-ammonifizierenden *W. succinogenes* Wildstamm, *W. succinogenes*  $\Delta$ *nosZ* und *W. succinogenes*  $p_{\text{nos}}$ *nosZ* Kulturen analysiert werden. Um die Produktion von N<sub>2</sub>O zu bestimmen, sollten die Stämme *W. succinogenes*  $\Delta$ *fdp*, *W. succinogenes*  $\Delta$ *nrhA* und *W. succinogenes*  $\Delta$ *fdp*  $\Delta$ *nrhA* bezüglich der gasförmigen Intermediate NO, N<sub>2</sub>O und N<sub>2</sub> untersucht werden. Um mögliche Zusammenhänge zwischen den gebildeten Gaskomponenten und dem Verhältnis des Elektronendonors Formiat zum Elektronenakzeptor Nitrat aufzuzeigen, wurden drei Varianten eines Nitrat-haltigen Mediums hergestellt. Alle eben genannten *W. succinogenes* Stämme sollten in diesen drei Varianten des Mediums vermehrt und auf ihre Nitrat-, Nitrit-, NO- und N<sub>2</sub>O- Umsätze hin untersucht werden.

Durch eine bioinformatische Analyse aller verfügbaren Sequenzen sollte die Diversität der atypischen cNosZ-Reduktase in Bakterien ermittelt und die Präsenz sowie die Organisation der dazugehörigen atypischen *nos*-Gencluster untereinander verglichen werden. Anhand der vorliegenden Daten und Literatur sollte ein Modell aller möglichen Elektronentransferwege vom Menachinol zur terminalen N<sub>2</sub>O-Reduktase erstellt werden. Die vermuteten physiologischen Elektronenüberträger NosC1, NosC2 und NosB sollten zunächst produziert und mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie isoliert werden.

---

### 3. Material und Methoden

---

#### 3.1. Organismen, Plasmide und Oligonukleotide

##### 3.1.1. Organismen

Die für diese Arbeit verwendeten Organismen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Stämme

Stamm	Genotyp und relevante Eigenschaften	Referenz
<i>W. succinogenes</i> DSMZ 1740	Wildstamm	DSMZ 1740
<i>W. succinogenes</i> $\Delta nosZ$	Cm <sup>R</sup> , Deletion des Gens der Distickstoffmonoxidreduktase	Diese Arbeit
<i>W. succinogenes</i> komp <sub>p<sub>nos</sub></sub> <i>nosZ</i>	Km <sup>R</sup> , Komplementation der Deletionsmutante $\Delta nosZ$	Diese Arbeit
<i>W. succinogenes</i> komp <sub>p<sub>nos</sub></sub> <i>nosZ</i> Tat	Km <sup>R</sup> , Komplementation der Deletionsmutante $\Delta nosZ$ mit der Distickstoffmonoxidreduktase mit einem Tat-Signalpeptid aus <i>hydA</i>	Diese Arbeit
<i>W. succinogenes</i> $\Delta nosG-H$	Cm <sup>R</sup> , Deletion der Gene <i>nosG</i> , <i>nosC1</i> , <i>nosC2</i> und <i>nosH</i>	Kern & Simon, 2008
<i>W. succinogenes</i> MK1 <i>nosC1</i>	Austausch von <i>nrfA</i> gegen <i>nosC1</i> in <i>W. succinogenes</i> <i>napA::cat</i>	Diese Arbeit
<i>W. succinogenes</i> MK1 <i>nosC2</i>	Austausch von <i>nrfA</i> gegen <i>nosC2</i> in <i>W. succinogenes</i> <i>napA::cat</i>	Diese Arbeit
<i>W. succinogenes</i> P <sub>nos</sub> <i>nosC1-Strep</i>	C-terminaler <i>Strep</i> -Tag an <i>nosC1</i> im <i>nos</i> -Operon	Melanie Kern, unveröffentlicht
<i>W. succinogenes</i> P <sub>nos</sub> <i>nosC2-Strep</i>	C-terminaler <i>Strep</i> -Tag an <i>nosC2</i> im <i>nos</i> -Operon	Melanie Kern, unveröffentlicht
<i>W. succinogenes</i> $\Delta nrfHA$	Cm <sup>R</sup> , Deletion der Gene des Cytochrom <i>c</i> Nitritreduktase-Komplexes	Simon <i>et al.</i> , 2003

Stamm	Genotyp und relevante Eigenschaften	Referenz
<i>W. succinogenes</i> $\Delta fdp$	Km <sup>R</sup> , Deletion des Gens des Flavodieisenproteins	Kern <i>et al.</i> , 2011b
<i>W. succinogenes</i> $\Delta fdp \Delta nrfHA$	Km <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Deletion des Gens des Flavodieisenproteins und Deletion der Gene des Cytochrom c Nitritreduktase-Komplexes	Kern <i>et al.</i> , 2011b
<i>W. succinogenes</i> <i>napA::cat</i>	Insertion von Cm <sup>R</sup> in <i>napA</i>	Melanie Kern, unveröffentlicht
<i>Sulfurimonas denitrificans</i>	Wildstamm	DSMZ 1251
<i>Denitrovibrio acetiphilus</i>	Wildstamm	DSMZ 12809
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>endA1 gyrA96(nal<sup>R</sup>) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB<sup>+</sup> <math>\Delta lacI^q \Delta(lacZ)M15]</math> hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>)</i>	Agilent
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) <math>\lambda</math>(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 Gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])</i>	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> C41 (DE3)	Derivat von BL21 (DE3) mit mindestens einer uncharakterisierten Mutation	Miroux & Walker, 1996
<i>Escherichia coli</i> C43 (DE3)	Derivat von C41 (DE3)	Miroux & Walker, 1996

### 3.1.2. Plasmide und Oligonukleotide

Die für diese Arbeit benötigten Starteroligonukleotide für die Amplifizierungen bzw. Sequenzierungen sowie die für die Klonierungen verwendeten Vektoren und weitere Plasmid-Konstrukte sind in den Tabelle 2, 3, 4 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Plasmid	relevante Eigenschaften	Referenz
pPR-IBA1	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, Amp <sup>R</sup> , T7-Promotor, C-terminaler <i>Strep</i> -Tag	IBA GmbH
pPR-IBA2	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, Amp <sup>R</sup> , T7-Promotor, N-terminaler <i>Strep</i> -Tag	IBA GmbH
pASK-IBA3	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, Amp <sup>R</sup> , tet-System, C-terminaler <i>Strep</i> -Tag	IBA GmbH
pASK-IBA2	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, Amp <sup>R</sup> , tet-System, C-terminaler <i>Strep</i> -Tag, OmpA-Signalsequenz für den Export ins Periplasma	IBA GmbH
pASK-IBA3	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, Amp <sup>R</sup> , tet-System, C-terminaler <i>Strep</i> -Tag	IBA GmbH
pMK1	<i>W. succinogenes</i> Integrationsvektor Km <sup>R</sup>	Melanie Kern, unveröffentlicht
pEC86	Km <sup>R</sup> , Helferplasmid zur Produktion von Cytochrom <i>c</i> in <i>E. coli</i>	Arslan <i>et al.</i> , 1998
pPR1-nosB1	Amp <sup>R</sup> , C-terminaler <i>Strep</i> -Tag an <i>nosB</i> , T7-Promotor	Zeidler, 2012
pASK3-nosB	Amp <sup>R</sup> , C-terminaler <i>Strep</i> -Tag an <i>nosB</i> , tet-System	Zeidler, 2012

Tabelle 3: In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

Plasmidname	Relevante Merkmale	Ursprungsvektor
pkomp <sub>p<sub>nos</sub></sub> <i>nosZ kan</i>	Km <sup>R</sup> , <i>nosZ</i> ohne IS1302, nativer <i>nos</i> -Promotor	pPR-IBA1
pkomp <sub>p<sub>nos</sub></sub> <i>nosZ Tat kan</i>	Km <sup>R</sup> , <i>nosZ</i> ohne IS1302 mit einem Tat-Signalpeptid aus <i>hydA</i> , nativer <i>nos</i> -Promotor	pPR-IBA1
pPR-IBA1-OmpA	Signalsequenz und MCS von pASK-IBA2	pPR-IBA1
pMK1- <i>nosC1</i>	Km <sup>R</sup> , C-terminaler <i>Strep</i> -Tag an <i>nosC1</i>	pMK-1
pMK1- <i>nosC2</i>	Km <sup>R</sup> , C-terminaler <i>Strep</i> -Tag an <i>nosC2</i>	pMK-1
pIBA1-OmpA <i>nosC1</i>	Amp <sup>R</sup> , C-terminaler <i>Strep</i> -Tag an <i>nosC1</i> , T7-Promotor, OmpA-Signalsequenz für Export ins Periplasma	pPR-IBA1
pIBA1-OmpA <i>nosC2</i>	Amp <sup>R</sup> , C-terminaler <i>Strep</i> -Tag an <i>nosC1</i> , T7-Promotor, OmpA-Signalsequenz für Export ins Periplasma	pPR-IBA1

Plasmidname	Relevante Merkmale	Ursprungsvektor
pIBA2-nosC1	Amp <sup>R</sup> , C-terminaler <i>Strep</i> -Tag an <i>nosC1</i> , tet-System, OmpA-Signalsequenz für Export ins Periplasma	pASK-IBA2
pIBA2-nosC2	Amp <sup>R</sup> , C-terminaler <i>Strep</i> -Tag an <i>nosC1</i> , tet-System, OmpA-Signalsequenz für Export ins Periplasma	pASK-IBA2
pASK-IBA2 <i>Suden_1302</i>	Amp <sup>R</sup> , C-terminaler <i>Strep</i> -Tag an <i>nosC1</i> aus <i>Sulfurimonas denitrificans</i> , tet-System, OmpA-Signalsequenz für Export ins Periplasma	pASK-IBA2
pASK-IBA2 <i>Dacet_0945</i>	Amp <sup>R</sup> , C-terminaler <i>Strep</i> -Tag an <i>nosC1</i> aus <i>Denitrovibrio acetiphilus</i> , tet-System, OmpA-Signalsequenz für Export ins Periplasma	pASK-IBA2

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Primer	Sequenz	Schnittstelle	Zielgen
BamHI cat F	GGGGATCCCGGTTTTGTTAATCCGCCA TATTGTGTTG	<i>Bam</i> HI	<i>cat</i>
BamHI cat R	GGGGATCCCGAATTTCTGCCATTCATC	<i>Bam</i> HI	<i>cat</i>
cat +	CCACCGTTGATATATCCCAATGGC		<i>cat</i>
BamHI Kan F	GGGGATCCAAAGCCACGTTGTGTCTCAA AATCTCTG	<i>Bam</i> HI	<i>kan</i>
BamHI Kan R	GGGGATCCCGCTGAGGTCTGCCTCGTG AAGAAGGTG	<i>Bam</i> HI	<i>kan</i>
kan +	CGCACCTGATTGCCCGACATTATC		<i>kan</i>
HydA Tat f	CGCTTTGGCAGTGAGAG		<i>hydA</i>
HydA Tat r	ATGCTAGAAGAGAAGGGC		<i>hydA</i>
HydA Tat K	AGTAAAGGTCGCTGGCAAAG		<i>hydA</i>
Pnos-F	GGGCGTGGGGAAGAAAATCTCC		P <sub>nos</sub>
Pnos-R	TTACCCACTCCTTTTGTTAATTTGGCAT TAAC		P <sub>nos</sub>
nosZ-10	TCGTCTGATCTTCAAACG		<i>nosZ</i>
[delta]nosZ-1	GCGAATTCGCGACAGGATTTGAGG	<i>Eco</i> RI	<i>nssC</i>
[delta]nosZ-2	CCGGATCCTTACCCACTCCTTTTTGTTA ATTTGG	<i>Bam</i> HI	<i>nssC</i>

Primer	Sequenz	Schnittstelle	Zielgen
[delta]nosZ-3	CCGGATCCAACCTCTCTCTCC	<i>Bam</i> HI	<i>nosB</i>
[delta]nosZ-4	CCAAGCTTGGGATACATCCCGATGTAGT GATTG	<i>Hind</i> III	<i>nosB</i>
kompNosZ-F	ATGCAAAGATTACTAAAGCAATCTTTGG TTG		<i>nosZ</i>
kompNosZ-R	TTAGAAGAGACCCGCGTTCTCATC		<i>nosZ</i>
kompNosZ-1	ATGGAACACAGAGGAATCGCCAAAT		<i>nosZ</i>
Screen NosZ-F	TATCTCAGAGCTTGCCTCGCTGG		<i>nosZ</i>
Screen NosZ-R	GCGTGGCCAGAAGAAGATAATAGG		<i>nosZ</i>
nosC1 <i>Bsa</i> I-F (2)	CAATACGGTCTCAGCGAAGGAGGAGA GGGCTAAG	<i>Bsa</i> I	<i>nosC1</i>
nosC1 <i>Bsa</i> I-R	CAGTCAGGTCTCAGCGCTTGGTTGACTC CTAAATTG	<i>Bsa</i> I	<i>nosC1</i>
nosC2 <i>Bsa</i> I-F (2)	CATAAAGGTCTCAGCGGCGCTTAGCGG GGGAG	<i>Bsa</i> I	<i>nosC2</i>
nosC2 <i>Bsa</i> I-R	CGACGAGGTCTCAGCGCTCTTGGAGAAT CCAGCAATC	<i>Bsa</i> I	<i>nosC2</i>
PCR755	GCCCTCTAGTGTGAAGTTATTTGAC		<i>nrfH</i>
ycf-24	CGAGGTTGTGCGTGAAGCG		<i>nrfI</i>
SeqMK-F	CCGAAGTCTAACCGCCACAC		pMK-1
SeqMK-R	GCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATG		pMK-1
OmpA-F	ATGAAAAAGACAGCTATCGC		<i>ompA</i>
OmpA-R	GGCCTGCGCTACGGTA		<i>ompA</i>
nosC1 <i>Bsa</i> I f	CAATACGGTCTCAGGCCAAGGAGGAGA GGGCTAAG	<i>Bsa</i> I	<i>nosC1</i>
nosC1 <i>Bsa</i> I r	CAGTCAGGTCTCAGCGCTTGGTTGACTC CTAAATTG	<i>Bsa</i> I	<i>nosC1</i>
nosC2 <i>Bsa</i> I f	CATAAAGGTCTCAGGCCGCGCTTAGCGG GGGAG	<i>Bsa</i> I	<i>nosC2</i>
nosC2 <i>Bsa</i> I r	CGACGAGGTCTCAGCGCTCTTGGAGAAT CCAGCAATC	<i>Bsa</i> I	<i>nosC2</i>
pPR-IBASeq-For	TAATACGACTCACTATAGGG		pPR-IBA
pPR-IBASeq-Rev	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG		pPR-IBA



Primer	Sequenz	Schnittstelle	Zielgen
pASK-IBASeq-For	GAGTTATTTTACCACTCCCT		pASK-IBA
pASK-IBASeq-Rev	CGCAGTAGCGGTAAACG		pASK-IBA
Dacet_0945 F BsaI	CAGTAGGGTCTCAGGCCAAGCAGAATCT CACTCC	BsaI	<i>nosC1</i>
Dacet_0945 R BsaI	AGCATGGGTCTCAGCGCATAATCCGCTC CGTTTGAC	BsaI	<i>nosC1</i>
Suden_1302 F BsaI	GGTACCGGTCTCAGGCCGATAATACAAA AAAAGAG	BsaI	<i>nosC1</i>
Suden_1302 R BsaI	GAGCAGGGTCTCAGCGCTTTTTCATC TCTTTAAT	BsaI	<i>nosC1</i>

## 3.2. Medien und Supplemente

### 3.2.1. Nährmedien und Supplemente für die Zucht von *Wolinella succinogenes*

*W. succinogenes* wurde anaerob mit Formiat als Elektronendonator und Fumarat oder Nitrat als Elektronenakzeptor vermehrt. Zur Zucht in Hungate-Röhrchen mit 10 ml Medium wurde dieses mit 1,3% (w/v) Brain-Heart Infusion (BHI) versetzt. Kulturen bis zu 800 ml wurden mit 0,5% (w/v) BHI, größere Ansätze bis 10 Liter mit 0,1% (w/v) supplementiert. Zur Anzucht transformierter Zellen oder zur Vereinzelung wurden Weichagarplatten mit 2,6% (w/v) BHI-Agar verwendet.

Alle Medien wurden mittels alternierendes Evakuieren durch eine Vakuumpumpe und Begasen mit molekularem Stickstoff anaerobisiert und bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

Zur Selektion von Transformanten oder zur Zucht von Mutanten wurde den Medien Chloramphenicol (12,5 mg/l) und/oder Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt.

#### Nitrat-Medium

Für die Analyse der Gaskomponenten Distickstoffmonoxid (N<sub>2</sub>O), Stickstoff (N<sub>2</sub>) und Stickstoffmonoxid (NO) in wachsenden Kulturen wurden 3 Nitrat-haltige Medien verwendet, deren Zusammensetzung in Tabelle 5 aufgelistet werden.

Ist das verwendete Nitrat-haltige Medium in dieser Arbeit nicht näher bezeichnet, handelt es sich immer um das in der Tabelle rechts beschriebene Medium mit 80 mM Formiat und 50 mM Nitrat.

Tabelle 5: Zusammensetzung von drei Nitrat-haltigen Medien

	80/50	80/10	50/50
Na-Formiat	80 mM	80 mM	50 mM
KNO <sub>3</sub>	50 mM	10 mM	50 mM
Tris	50 mM	50 mM	50 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 mM	1 mM	1 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 mM	5 mM	5 mM
Fumarsäure	5 mM	5 mM	5 mM
MgCl <sub>2</sub> <sup>*</sup>	1 mM	1 mM	1 mM
CaCl <sub>2</sub> <sup>*</sup>	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
Spurenelementsg.	0,2 ml/l	0,2 ml/l	0,2 ml/l
pH	7,9-8,0	7,9-8,0	7,9-8,0

\* Zugabe vor dem Autoklavieren aus einer 1000fachen Mg/Ca-Stammlösung

#### **Basismedium-Medium**

Na-Formiat	80 mM
Tris	50 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 mM
Fumarsäure	5 mM
MgCl <sub>2</sub> <sup>*</sup>	1 mM
CaCl <sub>2</sub> <sup>*</sup>	0,2 mM
<u>Spurenelementsg.</u>	<u>0,2 ml/l</u>
pH	7,5

\* Zugabe vor dem Autoklavieren aus einer 1000fachen Mg/Ca-Stammlösung

Dieses Basismedium wurde für die Wachstumsversuche mit Distickstoffmonoxid verwendet. Die Zugabe des inerten Gases N<sub>2</sub>O erfolgte je nach Bedarf über zwei verschiedene Verfahren. Zum einen konnte das Inkubationsgefäß mittels alternierendes Evakuieren durch eine Vakuumpumpe und Begasen mit Distickstoffmonoxid versetzt werden, zum anderen konnte ein definiertes Volumen des Gases über eine Injektionsspritze hinzugefügt werden. Hierfür wurde das Inkubationsgefäß zunächst mit molekularem Stickstoff anaerobisiert. Über eine Spritze wurde ein definiertes Volumen aus der Gasphase entnommen und durch dasselbe Volumen an Distickstoffmonoxid ersetzt.

---

### Formiat/Fumarat-Medium

Na-Formiat	100 mM
Fumarsäure	90 mM
Tris	50 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 mM
NH <sub>4</sub> Cl	5 mM
Na-Glutamat	1 mM
Natriumacetat	20 mM
KOH	200 mM
MgCl <sub>2</sub> <sup>*</sup>	1 mM
CaCl <sub>2</sub> <sup>*</sup>	0,2 mM
<u>Spurenelementsg.</u>	<u>0,2 ml/l</u>

pH 7,9-8,0

\* Zugabe vor dem Autoklavieren aus einer 1000fachen Mg/Ca-Stammlösung

### Mg/Ca-Lösung 1000x

0,74 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O

5,1 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O

ad 100 ml H<sub>2</sub>O bidest.

### Spurenelemente-Lösung SL8 (Pfennig & Trüper, 1981)

Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	5,2 g/l
FeCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,5 g/l
ZnCl <sub>2</sub>	70 mg/l
MnCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	100 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	62 mg/l
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	190 mg/l
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	17 mg/l
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	24 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	36 mg/l
In H <sub>2</sub> O bidest. lösen	

---

### **VS<sub>Y</sub>-Medium**

Na-Formiat	100 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	25 mM
Na-Succinat	10 mM
<u>Hefeextrakt</u>	<u>0,1 % (w/v)</u>
pH 7,0	

Vor dem Inokulieren wurde das VS<sub>Y</sub>-Medium mit 10 % (v/v) einer autoklavierten Na-Thioglycolat-Lösung (0,5% w/v) versetzt.

### **3.2.2. Nährmedium für *Escherichia coli***

Für die Zucht von *E. coli* Stämmen wurde ein Komplexmedium, bestehend aus Hefeextrakt, Natriumchlorid und Trypton verwendet. Das Medium wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert und nach Bedarf mit Ampicillin (100 mg/l), Kanamycin (50 mg/l) und/oder Chloramphenicol (25 mg/l) versetzt.

### **LB-Medium**

20 g LB (Roth) in 1 Liter H<sub>2</sub>O bidest. gelöst. Das Medium wurde von der Firma Carl ROTH (Carl Roth GmbH & Co KG) bezogen.

### **LB-Agar**

35 g LB-Agar (Roth) in 1 l H<sub>2</sub>O bidest. gelöst. Das Medium wurde von der Firma Carl ROTH (Carl Roth GmbH & Co KG) bezogen.

## **3.3. Kultivierung von Bakterien**

### **3.3.1. Zellzucht von *Wolinella succinogenes***

#### **Anaerobe Zucht**

Die Zucht von *W. succinogenes* wurde anaerob unter einer Stickstoff-Atmosphäre durchgeführt. Das Wachstum erfolgte in luftdicht verschlossenen Hungate-Röhrchen (1 - 10 ml), in Müller-Krempel-Flaschen (bis zu 800 ml) oder Glasfermentern (2 - 10 l). Die Medien wurden mittels steriler Einwegspritzen inokuliert (1 - 10% v/v) und gegebenenfalls mit entsprechenden Antibiotika versetzt. Flüssigkulturen wurden bei 37 °C bis zu 24 h und Kolonien auf Festmedium zwei bis drei Tage inkubiert.

---

## **Stammhaltung**

Für zwei Dauerkulturen eines Stammes wurden Zellen einer frischen 10 ml Kultur von *W. succinogenes* für 2 min bei 5000 rpm (Labofuge 200, Heraeus SEPATECH) sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in 1,5 ml Medium ohne Antibiotika resuspendiert. 2,2 ml anaerobisierte kalte Glycerollösung (87% v/v) wurden hinzugegeben und mit der Zellsuspension vermischt. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis wurden je 1,8 ml der Zellsuspension in zwei sterile Cryo-Röhrchen gefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### **3.3.2. Zellzucht von *Escherichia coli***

Die Kultivierung von aeroben Flüssigkulturen erfolgte schüttelnd in geeigneten Kulturgefäßen bei 20, 28 oder 37 °C. Zur Vereinzelung wurden die Zellen auf festen Nährboden ausplattiert.

### **3.3.3. Bestimmung der Zelldichte**

Die Zelldichte einer Bakterienkultur wurde mittels des Photometers „GENESYS 10S UV-VIS“ der Firma Thermo Scientific ermittelt. Für *W. succinogenes* wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm gemessen, für *E. coli* bei einer Wellenlänge von 600 nm. Ab einer OD<sub>600nm</sub> von etwa 0,6 wurde die Probe der Kultur zur Zelldichtemessung verdünnt.

### **3.3.4. Zellernte**

Kulturen wurden in der spät exponentiellen Wachstumsphase mittels Zentrifugation geerntet (15 min, 4 °C, 5000 rpm). Die Zellen wurden entweder sofort verwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **3.3.5. Zellaufschluss und Fraktionierung**

Die geernteten Zellen wurden in 10 ml Puffer (50 mM TrisHCl, pH 7,6) resuspendiert und entweder mittels eines Hochdruck-Zellaufschlussystems bei einem Druck von 1,35 kbar (Constant Cell Disruption Systems, IUL Instruments GmbH) oder mittels French Press bei einem Druck von 1,2 kbar (SLM Aminco) aufgeschlossen. Das Zellhomogenisat wurde erneut für 60 min bei 4 °C mit 45000 rpm zentrifugiert (Ultrazentrifuge XL-100K, Beckmann Optima, Rotor 70.1 Ti). Die lösliche Fraktion wurde in ein neues Röhrchen dekantiert, die sich im Pellet befindliche Membranfraktion in 2 ml Puffer (50 mM TrisHCl, pH 7,6) resuspendiert. Die Fraktionen wurden entweder sofort verwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

---

### **3.4. Bestimmung der Enzym- und Elektronentransportaktivität**

#### **3.4.1. Reduktion von N<sub>2</sub>O mit reduziertem Benzylviologen**

Alle verwendeten Puffer, Serumgefäße sowie die mit Gummistopfen verschlossenen Glasküvetten wurden mittels alternierenden Evakuierens und Begasens mit N<sub>2</sub> anaerobisiert. Die Reaktionen liefen bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 1 ml ab. Die Küvetten hatten eine Schichtdicke von 0,5 cm.

Die benötigten Zellen wurden in Formiat/Nitrat-Medium bei 37 °C gezogen und in der spätexponentiellen Phase bei 4 °C durch Zentrifugation geerntet (Sorvall Instruments RC5C). Das Pellet wurde in 1 ml Tris-Puffer (50 mM, anaerob, pH 7,5) resuspendiert und in ein luftdicht verschließbares Serumgefäß überführt, welches anschließend anaerobisiert wurde. In die Küvetten wurde zunächst 960 µl Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,0), 10 µl Benzylviologen (0,1 M) und 10 µl einer Dithionit-Lösung (eine Spatelspitze Dithionit in 1 ml H<sub>2</sub>O) vorgelegt und die Absorption des dunkelblau gefärbten Reaktionsansatzes bei einer Wellenlänge von 546 nm gemessen. Bei konstanten Bedingungen erfolgte die Zugabe einer definierten Menge der zu untersuchenden Zellsuspension. Die Oxidation von Benzylviologen startete durch die Zugabe einer bestimmten Menge von gasförmigen N<sub>2</sub>O und wurde über einen Zeitraum von maximal 15 min photometrisch verfolgt (GENESYS 10S UV-VIS Spectrophotometer; Software: VISIONlite).

#### **3.4.2. Reduktion von N<sub>2</sub>O mit reduziertem Pferdeherzcytochrom**

Alle verwendeten Puffer, Serumgefäße sowie die mit Gummistopfen verschlossenen Glasküvetten wurden mittels alternierenden Evakuierens und Begasens mit N<sub>2</sub> anaerobisiert. Die Reaktionen liefen bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 1 ml ab. Die Küvetten hatten eine Schichtdicke von 0,5 cm.

Die benötigten Zellen wurden in 800 ml Formiat/Nitrat-Medium bei 37 °C gezogen. Die Ernte, der Aufschluss sowie die Fraktionierung erfolgten wie zuvor beschrieben (Kapitel 3.3.4. und 3.3.5.). Die Fraktionen wurden in luftdicht verschließbare Serumgefäße überführt und definierte Mengen zu dem vorgelegten Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,0) hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde mit 0,25 mM Dithionit und 5 µM Pferdeherzcytochrom (Monohäm Cytochrom c, Sigma Aldrich) versetzt. Die Reaktion startete durch die Zugabe einer definierten Menge an gasförmigem N<sub>2</sub>O. Die Bestimmung der Absorption (GENESYS 10S UV-VIS Spectrophotometer; Software: VISIONlite) erfolgte in einem Bereich zwischen 500 - 600 nm im Zeitintervall von 15 min.

---

### 3.4.3. Elektronentransport von Formiat zu N<sub>2</sub>O

Die benötigten Zellen wurden in Formiat/Nitrat- oder Formiat/Fumarat-Medium bei 37 °C kultiviert und in der spät exponentiellen Phase durch Zentrifugation bei 4 °C geerntet (Eppendorf Centrifuge 5804 R). Das Pellet wurde durch zweimaliges Waschen mit einem Saccharose-haltigen Tris-Puffer (50 mM Tris, 0,5 M Saccharose, pH 8,0) von Rückständen des Mediums befreit und in 5 ml anaerobisiertem BICIN-Puffer (150 mM, pH 8,5) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein luftdicht verschließbares Gefäß überführt und mittels alternierenden Evakuierens durch eine Vakuumpumpe und Begasen mit N<sub>2</sub>O anaerobisiert. Nach 10 minütiger Inkubation bei 37 °C erfolgte der Start der Reaktion durch die Zugabe von Formiat (Endkonzentration im Ansatz: 50 mM). Die Entnahmen von jeweils 100 µl Probe zur Bestimmung der zeitabhängigen Änderung der Formiatkonzentration erfolgte zu definierten Zeitpunkten (0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 min). Nach Zentrifugation der Proben wurde der Überstand in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

## 3.5. Molekularbiologische Methoden

### 3.5.1. Isolierung von Nukleinsäuren

#### Präparative Plasmidisolierung

Die für Klonierungen und Sequenzierungen eingesetzten Plasmide wurden mittels des GeneJet Plasmid Miniprep Kit von Fermentas oder dem GenElute HP Plasmid Miniprep Kit von Sigma-Aldrich isoliert. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

#### Analytische Plasmidisolation

Für eine kostengünstigere Aufreinigung von Plasmiden aus *E. coli* diente die „Rapid-Miniprep“ nach einer alkalischen Lyse der Zellen. Dazu wurden 1,5 ml einer frischen Flüssigkultur bei 13.000 rpm für 1 min abzentrifugiert (Centrifuge 5415 D, Eppendorf). Das Zellpellet wurde in 150 µl Puffer 1 resuspendiert und nach der Zugabe von 150 µl Puffer 2 vorsichtig 6-mal invertiert. Nach der Neutralisierung mit 250 µl Puffer 3 und wiederholtem Invertieren wurde das Gemisch bei 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl Isopropanol versetzt und erneut bei 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Nach der Zugabe von 100 µl eiskaltem Ethanol (70% v/v) zum Pellet erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 13.000 rpm für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nach der Trocknung in einem Heizblock bei 37 °C in TE-Puffer aufgenommen (high copy Plasmide in 50 µl, low copy Plasmide in 30 µl).

---

#### Puffer 1

50 mM Tris/HCl pH 8

10 mM EDTA

100 µg/ml RNase

Lagerung bei 4 °C

#### Puffer 2

0,2 M NaOH

1% (w/v) SDS

#### Puffer 3

3,2 M Kaliumacetat

pH 5,0 mit Essigsäure eingestellt

#### TE-Puffer

10 mM Tris/HCl pH 8

1 mM EDTA

### **3.5.2. Agarose-Gelelektrophorese**

Durch die Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente aufgrund ihrer molekularen Größe im elektrischen Feld aufgetrennt. Dabei betrug die Agarosekonzentration 0,8 - 1,8% (w/v) in Abhängigkeit von der Größe des erwarteten Fragmentes. Als Gel- sowie Laufpuffer wurde 1 x TAE-Puffer genutzt. Die Auftrennung erfolgte bei einer angelegten Spannung von 80 – 120 V. Als Größenstandard diente der Gene Ruler DNA Ladder Mix von Fermentas. Zur farblichen Markierung wurde den Proben jeweils ein 6-fach Probenpuffer zugegeben. Dies dient zugleich der Erhöhung der Probendichte zum Auftragen in die Geltasche.

Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte nach einer 20 minütigen Färbung in Ethidiumbromid (1 µg/ml in H<sub>2</sub>O) durch UV-Licht, welches das Ethidiumbromid (EtBr) anregt und dann bei einer Wellenlänge von 590 nm Licht emittiert. Überschüssiges Ethidiumbromid wurde zuvor durch eine 15 minütige Inkubation des Gels in Wasser bei Raumtemperatur entfernt.

#### TAE-Puffer (50x)

Tris 242 g

EDTA (0,5 M, pH 8) 100 ml

100% Essigsäure 57,1ml

Auf 1 l mit H<sub>2</sub>O auffüllen

#### 6-fach Probenpuffer

0,25% (w/v) Orange G

0,25% (w/v) Xylencyanol

0,25% (w/v) Bromphenolblau

gelöst in H<sub>2</sub>O mit 15% Glycerin (w/v)

### **3.5.3. Amplifikation von DNA-Fragmenten**

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR). Je nach Größe des zu amplifizierenden Fragmentes wurde entweder die Phusion DNA-Polymerase (Finnzymes) oder die Biotaq Red DNA-Polymerase (Bioline) nach Angabe des Herstellers verwendet. Die PCR erfolgte in einem Thermocycler mit beheizbarer Deckplatte (Professional TRIO Thermocycler, Biometra).



---

### 3.5.4. Reinigung von DNA-Fragmenten

Die amplifizierten Fragmente wurden entweder nach der PCR Reaktion über das „GeneJet Gel Extraction Kit“ (Fermentas) nach dem Protokoll des Herstellers gereinigt oder zuvor in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wurde kurz in EtBr angefärbt und das Fragment mit der gewünschten Größe ausgeschnitten. Dieses wurde dann mit Hilfe des Extraktion Kits aufgereinigt.

### 3.5.5. Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

#### Phosphorylierung

Die Phosphorylierung erfolgte mittels der T4 Polynukleotidkinase (New England Biolabs) nach dem Protokoll des Herstellers.

#### Dephosphorylierung

Die Dephosphorylierung erfolgte mittels der FAST Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Fermentas) nach dem Protokoll des Herstellers.

#### Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen (Fermentas, New England Biolabs) nach dem Protokoll der Hersteller.

#### Ligation von DNA-Fragmenten

Für alle Ligationsschritte in dieser Arbeit wurde die T4 DNA Ligase (Fermentas) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

### 3.5.6. Sequenzanalyse doppelsträngiger DNA

DNA-Proben wurden zum Sequenzierungsservice der LMU München geschickt. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen erfolgte mittels der PC-Programme Sequence Scanner v 1.0 und Clone Manager.

### 3.5.7. Transformation von *Escherichia coli*

#### Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Die Zellen wurden für folgende Transformationsexperimente durch die Behandlung mit Calciumchlorid kompetent gemacht. Dazu wurden 100 ml Kultur bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 schüttelnd bei 37°C inkubiert und anschließend für 10 min auf Eis abgekühlt. Das

---

Zellsediment des folgenden Zentrifugationsschrittes (5 min, 5000 rpm, 4 °C) wurde in 2,7 ml steriler, eiskalter Calciumchloridlösung (100 mM) resuspendiert und mit 2,3 ml steriler, eiskalter Glycerol-Lösung (50% v/v) vorsichtig vermischt. Die Zellsuspension wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### **Transformation**

Für die Transformation wurde ein Aliquot mit chemisch kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und entweder mit dem Ligationsansatz oder 20 ng gereinigtem Plasmides versetzt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C im Heizblock (Thermomixer comfort, Eppendorf). Anschließend wurden 500 µl LB hinzugegeben und für 1h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. 100 bzw. 500 µl Transformationsansatz wurden auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C für 20 h inkubiert.

#### **3.5.8. Transformation von *Wolinella succinogenes***

Für die Transformation von *W. succinogenes* Zellen wurde mit 1 ml aus einer Formiat/Fumarat-Übernachtskultur 10 ml Formiat/Nitrat-Medium inokuliert und bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0,3 bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde in sterile Schraubröhrchen überführt und die Zellen mittels Zentrifugation (5 min, 5300 rpm, Labofuge 200, Heraeus SEPATECH) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10 ml kalter, anaerobisierter Saccharoselösung (0,3 M) resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min, 5300 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in der verbliebenden Lösung (50 - 100 µl) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit der gewünschten Plasmidmenge vermischt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 1,25 kV, einem Widerstand von 800 Ω und einer Kapazität von 25 µF (BioRad Pulse Controller mit BioRad Gene Pulser). Der Ansatz wurde im Anschluss in 1 ml gekühltem Formiat/Nitrat-Medium aufgenommen und in ein steriles, anaerobisiertes Hungate-Röhrchen überführt. Nach einer Inkubation von 1 - 2 h bei 37 °C wurde die Zellsuspension in Weichagar mit entsprechendem Antibiotikum eingegossen und für 2 Tage bei 37 °C in Anaerobengefäßen (OXOID) unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert.

### **3.6. Biochemische Methoden**

#### **3.6.1. Bestimmung von Nitrat**

Nitrat bildet in einer stark sauren Lösung mit 2,6-Dimethylphenol einen 2,6-Dimethyl-4-Nitrophenol-Komplex, dessen Konzentration photometrisch gemessen werden kann (Hartley

& Asai, 1963). Mögliches vorhandenes Nitrit in der Probe wird mit Amidosulfonsäure entfernt. 0,1 ml Probe, mit einer maximalen Konzentration von 0,4 mM Nitrat, wurde mit 0,1 ml Amidosulfonsäure (1% w/v in H<sub>2</sub>O) und 0,8 ml Säuregemisch (96% iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 85% iger H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in einem Verhältnis 1:1) gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 0,1 ml 2,6-Dimethylphenol-Lösung (0,12 g in 100 ml 100% iger Essigsäure) wurde erneut für 60 min inkubiert und die Extinktion in Quarzküvetten (Schichtdicke: 1 cm) bei einer Wellenlänge von 334 nm bestimmt. Die Nitratkonzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$c(mM) = \frac{\Delta OD}{\epsilon} \times 11 \qquad \epsilon_{334nm} = 8,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

### 3.6.2. Bestimmung von Nitrit

Nitrit diazotiert mit Sulfanilamid zu Diazoniumsalz, welches mit N-Ethylendiamin einen Komplex bildet, dessen Konzentration photometrisch bestimmt werden kann (Rider & Mellon, 1946).

0,2 ml Probe, mit einer maximalen Konzentration von 0,1 mM Nitrit, wurde mit 0,2 ml Sulfanilamid (1% w/v in 2,5 M HCl) vermischt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Naphthylethylen (0,1% w/v in H<sub>2</sub>O) erfolgte eine weitere 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Extinktion wurde nach der Zugabe von 0,4 ml H<sub>2</sub>O bei einer Wellenlänge von 546 nm bestimmt. Die Nitritkonzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$c(mM) = \frac{\Delta OD}{\epsilon} \times 5 \qquad \epsilon_{546nm} = 50 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

### 3.6.3. Bestimmung von Formiat

Die Bestimmung erfolgt enzymatisch durch die Reduktion von NAD<sup>+</sup> durch Formiat in Gegenwart der Formiat-Dehydrogenase (FHD). 20 µl Probe (0 – 5 mM Formiat) wurden mit 500 µl Phosphat-Puffer (150 mM, pH 7,5) und 60 µl NAD<sup>+</sup> (20 mM in H<sub>2</sub>O) vermischt und die Start-Extinktion bei einer Wellenlänge von 366 nm gemessen. Nach Zugabe von 5 µl FDH (100 U/ml) wurde das Reaktionsgemisch für 60 min bei 37 °C inkubiert bevor die End-Extinktion bei 366 nm bestimmt wurde. Die Formiatkonzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$c(mM) = \frac{\Delta OD_{Ende} - \Delta OD_{Start}}{\epsilon} \times 29,25 \qquad \epsilon_{366nm} = 3,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

### 3.6.4. Bestimmung von NO, N<sub>2</sub>O und N<sub>2</sub>

Die Bestimmung der Konzentrationen der Gase erfolgte an der Norwegian University of Life Sciences in Ås (Norwegen) in den Arbeitsgruppen von Herrn Professor Lars R. Bakken und Frau Professor Åsa Frostegård. Durch das automatisierte Gas-Analyse-System (Abb. 7) konnte die Gasanalyse aus wachsenden Kulturen zeitnah durchgeführt werden. Es konnten maximal 30 Inkubationsgefäße mit einem Gesamtvolumen von 120 ml beprobt werden. Mittels eines Autosamplers (CTC GC-PAL, Agilent), der mit einer peristaltischen Pumpe verbunden ist, erfolgt die Entnahme von 2 ml Gasphase. Das entnommene Volumen wird durch die Injektion von Helium und nicht benötigter Probe aufgefüllt. Dabei wird das Septum der Inkubationsgefäße mit einer Nadel durchstoßen, aber niemals zweimal am gleichen Punkt. Die entnommene Probe wird über sogenannte „sample loops“ aufgeteilt und zu den entsprechenden Säulen weitergeleitet. Für die Analyse wurde ein Gaschromatograph der Serie Varian CP4900 verwendet, der mit zwei Säulen (poraPlot, Molsieve) ausgestattet ist. Zur Detektion von Distickstoffmonoxid (N<sub>2</sub>O) und Stickstoff (N<sub>2</sub>) wurde ein Wärmeleitfähigkeitsdetektor (TCD), für Stickstoffmonoxid (NO) ein „Chemoluminescence NOx analyser“ Model 200A verwendet (Molstad *et al.*, 2007).

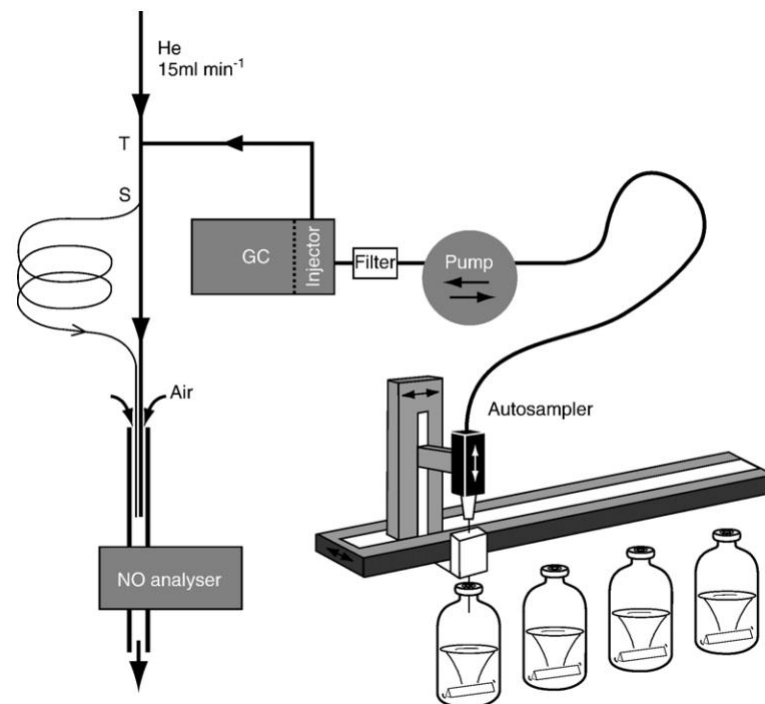


Abb. 7: Das automatisierte Gas-Analyse-System (Molstad *et al.*, 2007)

Das automatisierte Gas-Analyse-System verfügt über eine Datenverarbeitungssoftware (Galaxie), die alle Daten eines Experimentes in einer Datei zusammenfasst. Dabei sind die sogenannten Rohdaten nach Inkubationsgefäß, detektiertem Gas und Probenzeitpunkt

---

aufgeteilt. Für die Auswertung dieser Daten wurde die Datei aus Galaxie nach Excel exportiert. In jedem Experiment wurden Standards mit bekannten anfänglichen Stickstoff- und Sauerstoff-Konzentrationen mitgeführt und im selben Zeitintervall wie die Kulturen beprobt. Das für die Messung entnommene Volumen aus den Inkubationsgefäßen wurde durch Helium ersetzt, was zu einer Verdünnung der anfänglichen Konzentration führt. Diese Verdünnung kann auf Grund der erwarteten Konzentration und der gemessenen Konzentration der Standards berechnet werden. Der daraus resultierende Verdünnungsfaktor wird nun für alle Berechnungen der Gaskomponenten der Kulturen in Excel einberechnet. Auf Grundlage dieser korrigierten Werte wurden die Berechnungen und die Graphen in dieser Arbeit erstellt.

### 3.6.5. Proteinbestimmung nach der Biuret-Methode mit KCN

Für die Proteinbestimmung mittels Biuret (Bode *et al.*, 1968) wurde maximal 1 mg Protein im Test eingesetzt. 50 µl Probe wurden mit 200 µl 1M Trichloressigsäure und 750 µl Wasser vermischt, 10 min bei Raumtemperatur und anschließend 5 min bei 100 °C im Heizblock inkubiert. Nach dem Abkühlen der 1,5 ml Reaktionsgefäße erfolgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 min. Das Pellet wurde in 500 µl Biuret-Reagens resuspendiert, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 500 µl Wasser aufgefüllt. Das Gemisch wurde in eine Küvette überführt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 546 nm gemessen (E1). Durch die Zugabe einer Spatelspitze Kaliumcyanid (KCN) kommt es zur Entfärbung des Gemisches und die Extinktion wurde erneut bestimmt (E2). Im Blindwert wurde anstelle einer Probe Wasser verwendet. Die Proteinkonzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$c \left[ \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] = \frac{(E_1 - E_2) - (E_{1\text{Blindwert}} - E_{2\text{Blindwert}})}{d \times \varepsilon} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Verdünnungsfaktor: 20

Schichtdicke der Küvette: 1 cm

$$\varepsilon_{546\text{nm}} = 0,266 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

#### Biuret-Reagens

1,5 g CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O

4,5 g K-Na-Tartrat x 4 H<sub>2</sub>O

4 g NaOH

2,5 g Kaliumjodid

Die Chemikalien wurden in dieser Reihenfolge in H<sub>2</sub>O gelöst. Das Endvolumen betrug 500 ml.

### 3.6.6. Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

#### SDS-PAGE nach Lämmli

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-PAGE mit der Methode nach Lämmli (1970). Die Acrylamid-Konzentration im Sammelgel betrug 4%, im Trenngel variierte sie in Abhängigkeit von der Proteingröße zwischen 10 - 15%. Die Zusammensetzung der Gele ist den Tabellen 6 und 7 zu entnehmen. Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Kammern (Bio Rad; Mini PROTEAN® Tetra Cell) bei einer Stromstärke von 30 mA im Sammelgel und nach Einlaufen der Proben bei 50 mA pro Gel im Trenngel.

Die zu untersuchenden Proben wurden in Denaturierungspuffer (4 fach Roti-Load1, Carl Roth GmbH) aufgenommen und bei 95 °C für 10 min im Heizblock inkubiert. Als Standard diente der Protein-Standard Page-Ruler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) oder Page-Ruler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas).

Tabelle 6: Sammelgel  
(2 Gele mit einer Dicke von 1,5 mm)

	4%
Acrylamid	1 ml
H <sub>2</sub> O	3,4 ml
Sammelgelpuffer	1,5 ml
SDS (10% w/v)	60 µl
APS (10% w/v)	20 µl
TEMED	12 µl

Tabelle 7: Trenngel  
(2 Gele mit einer Dicke von 1,5 mm)

	10%	12,5%	15%
Acrylamid	5 ml	6,25 ml	7,5 ml
H <sub>2</sub> O	6 ml	4,75 ml	3,5 ml
Trenngelpuffer	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
SDS (10% w/v)	150 µl	150 µl	150 µl
APS (10% w/v)	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	25 µl	25 µl	25 µl

#### Laufpuffer 10x

30 g/l Tris  
144 g/l Glycin  
10 g/l SDS  
Lösen in H<sub>2</sub>O bidest.

#### Trenngelpuffer

1,5 M Tris/HCl  
pH 8,8

#### Sammelgelpuffer

0,5 M Tris/HCl  
pH 6,8

#### Acrylamid-Stammlösung (37,5:1)

30% Acrylamid  
0,8% Bisacrylamid

#### Coomassie-Färbung

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung von 20 µg Proteingemisch pro aufgetragener Probe im SDS-Gel wurde dieses mittels Coomassie-Schnellfärbelösung angefärbt. Dazu wurde

---

das Gel mehrfach mit Wasser bedeckt, in der Mikrowelle erwärmt und 2 min schüttelnd inkubiert. Das Wasser wurde verworfen und die Schnellfärbelösung hinzugegeben, in der Mikrowelle erwärmt und bis zur gewünschten Bandenintensität angefärbt. Bei dieser Methode wird der Hintergrund kaum angefärbt. Sollte jedoch eine Entfärbung nötig gewesen sein, wurde das Gel über Nacht in H<sub>2</sub>O auf dem Schüttler entfärbt.

#### Coomassie-Schnellfärbelösung

75 mg Coomassie G250 Brilliant Blue in 1 l H<sub>2</sub>O bidest.

2 – 3 h rühren

3 ml konzentrierte Salzsäure zugeben (Endkonzentration 35 mM)

Lösung dunkel lagern

#### **Häm-Färbung**

Für die Häm-färbung (Francis & Becker, 1984) wurden zunächst 100 - 200 µg Proteingemisch mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine anschließende 30 minütige Inkubation in TCA (12,5% w/v) fixiert. Es folgten 3 Waschschrte mit Wasser für je 10 min, die Zugabe einer frisch angesetzten Färbelösung und eine Inkubation von 60 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (DUOMAX 1030, Heidolph Instruments). Danach wurde die Färbelösung entfernt und das Gel mit Wasser abgespült.

#### Färbelösung

100 mg Dimethoxybenzidin in 90 ml H<sub>2</sub>O lösen

15 min bei Raumtemperatur rührend inkubieren

Zugabe von 10 ml Natriumcitrat (0,5 M, pH 4,4)

0,2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% ig)

#### **Western-Blot ("Semi-Dry"-Methode)**

Für den Western-Blot wurden zunächst 50 µg Proteingemisch pro aufgetragener Probe mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die PVDF-Membran, auf die die Proteine übertragen werden sollten, wurde mit Methanol befeuchtet und zusammen mit dem Gel und den in Puffer getränkten Whatman-Papieren, in folgender Reihenfolge aufgebaut.

Anode +      4x Whatman-Papier (Anodenpuffer I)  
                  2x Whatman-Papier (Anodenpuffer II)  
                  PVDF-Membran  
                  Gel  
Kathode -     6x Whatman-Papier (Kathodenpuffer)

Der Blot erfolgte für 2 h bei einer Stromstärke von 0,8 mA / cm<sup>2</sup> Gel.

---

<u>Anodenpuffer I</u>	<u>Anodenpuffer II</u>	<u>Kathodenpuffer</u>
25 mM Tris/HCl	0,3 M Tris/HCl	25 mM Tris/HCl
20% (v/v) Methanol	20% (v/v) Methanol	40 mM Aminocapronsäure
		20% (v/v) Methanol

### 3.6.7. Heterologe Produktion von Proteinen

Für die Produktion rekombinanter Proteine wurde zunächst der gewünschte *E. coli* Stamm mit dem entsprechenden Plasmid transformiert (Kapitel 3.5.7.). Die Zellen von unterschiedlichen Kolonien wurden jeweils in 5 ml LB-Medium in Gegenwart des erforderlichen Antibiotikums über Nacht angezogen, um damit 5 bzw. 50 ml Tageskulturen mit einer OD<sub>600nm</sub> von 0,05 zu inokulieren und diese erneut bei 37 °C, 28 °C oder bei 20 °C schüttelnd zu bebrüten. Bei einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 - 0,7 dieser Kulturen wurde durch die Zugabe des Induktors Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG; Endkonzentration im Ansatz: 0,5 mM) oder Anhydrotetracyclin (AHT; Endkonzentration im Ansatz: 0,4 μM) die Genexpression gestartet. In Abhängigkeit der gewählten Temperatur erfolgte die Entnahme von Proben zur Überprüfung der Produktion zu bestimmten Zeitpunkten. Die Analyse erfolgte je nach Protein und produzierter Menge über Häm-Färbung, ELISA oder Coomassie-Färbung (Kapitel 3.6.6.).

Um die Produktion zu unterstützen wurde das Medium nach Bedarf mit einer Eisenlösung (0,4 ‰ v/v) und mit 0,9 mM δ-Aminolävulinat versetzt.

#### Eisenlösung

FeSO <sub>4</sub>	0,5 M
Ascorbinsäure	0,5 M

In Wasser gelöst und steril filtriert, Lagerung bei -20 °C

### 3.6.8. *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung von Proteinen mit einem angefügten *Strep*-Tag erfolgte über das *Strep*-tag® - *Strep*-Tactin®-System der Firma IBA GmbH. Die Ernte, der Aufschluss sowie die Fraktionierung erfolgten wie beschrieben (Kapitel 3.3.5.). Für die Aufreinigung der löslichen Fraktion wurde eine Säule mit 1 ml Bettvolumen (*Strep*-Tactin Superflow, high capacity, IBA) eingesetzt. Die Durchführung der Chromatographie erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.



---

### 3.7. ELISA

Mittels Western Blot wurden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine von einem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran übertragen, welche über Nacht in 1 x PBS mit 3% (w/v) Albumin Fraktion V (BSA) bei Raumtemperatur schüttelnd inkubierte. Anschließend wurde die Membran für die Immunodetektion mit dem entsprechenden 1. Antikörper (Verdünnung in 1 x PBS mit 1% (w/v) BSA nach Angabe des Herstellers) für 4 h schüttelnd inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Membran mit 1 x PBS-Tween (0,1% v/v) für je 15 min bei Raumtemperatur erfolgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper (Verdünnung in 1 x PBS nach Protokoll des Herstellers) für 2 h. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit 1 x PBS-Tween (0,1% v/v) erfolgte die Zugabe der Chloronaphthol-Lösung. Die Reaktion wurde mit dem Waschen der Membran gestoppt.

Der Antikörper gegen cNosZ aus *W. succinogenes* stammt von Anja Pomowski aus dem Arbeitskreis Einsle (Universität Freiburg, Institut für Biochemie). Der Antikörper wurde 1:2000 in 1 x PBS mit 1% (w/v) BSA verdünnt. Der 2. Antikörper war ein Anti-IgG aus Kaninchen und wurde nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

Der Antikörper gegen *Strep*-Tag II (IBA GmbH) wurde nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

#### 10 x PBS (Phosphate buffered saline)-Puffer

72 g/l	NaCl
14,2 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
2,8 g/l	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O

#### Chloronaphthol-Lösung (für jeden ELISA frisch hergestellt)

60 mg	4-Chloro-1-Naphthol in
20 ml	Ethanol (p.a.) lösen
80 ml	0,1 M Tris/HCl, pH 7,5
50 µl	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30% ig)

---

## 4. Ergebnisse

---

### 4.1. Charakterisierung des N<sub>2</sub>O-Stoffwechsels in *W. succinogenes* Stämmen

Die Charakterisierung des N<sub>2</sub>O-Stoffwechsels in *W. succinogenes* beinhaltet zum einen die Untersuchung der N<sub>2</sub>O-Produktion und zum anderen die Untersuchung des N<sub>2</sub>O-Verbrauchs. Für die Bestimmung der N<sub>2</sub>O-Reduktionsrate in ammonifizierenden Kulturen wurden die Stämme *W. succinogenes* Wildstamm, *W. succinogenes*  $\Delta nosZ$  und *W. succinogenes*  $p_{komp_{nosZ}}$  verwendet. Zellen von *W. succinogenes* Wildstamm kodieren für eine N<sub>2</sub>O-Reduktase, welche C-terminal eine Monohäm Cytochrom c-Domäne besitzt. Auf Grund dieser Häm c-Gruppe wird das Protein als cNosZ bezeichnet. Allerdings ist das cNosZ kodierende Gen *nosZ* in *W. succinogenes* Wildstamm durch ein Insertionselement (IS1302) unterbrochen und vermutlich inaktiviert. *W. succinogenes*  $\Delta nosZ$  besitzt kein *nosZ*-Gen, während *W. succinogenes*  $p_{komp_{nosZ}}$  für ein intaktes *nosZ* ohne Insertionselement kodiert.

*W. succinogenes* verfügt über keine bislang bekannten respiratorischen NO-Reduktasen, deren Produkt N<sub>2</sub>O ist. Daher wurden für die Untersuchung der N<sub>2</sub>O-Produktion in ammonifizierenden Kulturen die Stämme *W. succinogenes*  $\Delta nrfHA$ , *W. succinogenes*  $\Delta fdp$  und *W. succinogenes*  $\Delta nrfHA \Delta fdp$  verwendet. Die Beteiligung der Cytochrom c Nitritreduktase (NrfA) sowie des Dieisenflavoproteins (Fdp) an der Abwehr von nitrosativem Stress in *W. succinogenes* konnte bereits nachgewiesen werden (Kern *et al.*, 2011b). Das oder die entstehenden Produkte der NO-Detoxifikation sind bislang jedoch unbekannt.

Alle eben genannten *W. succinogenes* Stämme wurden hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens sowie ihrer Fähigkeit Nitrat und Nitrit umzusetzen charakterisiert. Des Weiteren wurden die Gase Stickstoffmonoxid (NO), Distickstoffmonoxid (N<sub>2</sub>O) und Stickstoff (N<sub>2</sub>) bestimmt. Variationen im Verhältnis des Elektronendonors (Formiat) zum –akzeptor (Nitrat) sollten Zusammenhänge zwischen der Verfügbarkeit an Formiat oder Nitrat und der Produktion sowie dem Verbrauch der gebildeten Gase NO, N<sub>2</sub>O und N<sub>2</sub> aufzeigen. Daher wurden drei Varianten eines Nitrat-haltigen Mediums (Tabelle 8) mit unterschiedlichen Verhältnissen von Elektronendonator zu –akzeptor auf Basis des beschriebenen Nitrat-Mediums (Kapitel 3.2.1.) verwendet. Für die Reduktion von Nitrat zu Nitrit werden zwei Elektronen benötigt. Diese werden durch die Oxidation von einem Molekül Formiat bereitgestellt. Für die Reduktion von Nitrit zu Ammonium werden sechs weitere Elektronen benötigt. Daraus ergibt sich, dass für eine Reduktion von einem Molekül Nitrat zu Ammonium insgesamt acht Elektronen durch die Oxidation von vier Molekülen Formiat zur Verfügung gestellt werden müssen. Die Menge an verfügbarem Formiat als Elektronendonator muss folglich um das Vierfache höher sein, als die Menge des Elektronenakzeptors Nitrat im Falle einer vollständigen Reduktion. Auf Grundlage

des Verhältnisses der übertragbaren Elektronen, lassen sich die drei Varianten des Nitrat-haltigen Mediums in zwei Kategorien einordnen:

- Formiat-limitiert/Nitrat-reich: Es kann keine vollständige Reduktion von Nitrat zu Ammonium erfolgen, da nicht ausreichend Formiat vorhanden ist. Es kommt infolge dessen zu einer Anreicherung von Nitrit.
- Formiat-reich/Nitrat-limitiert: Es kann eine vollständige Reduktion von Nitrat zu Ammonium in einer reinen Ammonifikation erfolgen.

Tabelle 8: Zusammensetzung der drei Nitrat-haltigen Medien

	Formiat (mM)	Nitrat (mM)	Verhältnis auf Basis von übertragbaren Elektronen (e <sup>-</sup> donor : e <sup>-</sup> akzeptor)
Formiat-limitiert/Nitrat-reich	80	50	1:2,5
Formiat-limitiert/Nitrat-reich	50	50	1:4
Formiat-reich/Nitrat-limitiert	80	10	2:1

Für die Bestimmung der optischen Dichte, der Nitrat- und Nitrit-Konzentration wurden Zellen der *W. succinogenes* Stämme in 120 ml Inkubationsgefäßen mit 50 ml Medium, welche zuvor mit Stickstoff anaerobisiert wurden, vermehrt. Die Inkubation erfolgte stehend bei 37 °C mit einer stündlich Probenentnahme bis zum Erreichen der stationären Phase.

Die Analyse der Gaskomponenten Stickstoffmonoxid (NO), Distickstoffmonoxid (N<sub>2</sub>O) und Stickstoff (N<sub>2</sub>) in wachsenden Kulturen wurde mit Hilfe eines Gaschromatographen an der Norwegian University of Life Science in Ås durchgeführt (Kapitel 3.6.4.). Die Anzucht der *W. succinogenes* Stämme erfolgte ebenfalls in 120 ml Inkubationsgefäßen mit 50 ml Medium. Des Weiteren wurde das identische Konzentrat für Nitrat-haltige Medien verwendet, welches zuvor für die Bestimmung der optischen Dichte, der Nitrat- und Nitrit-Konzentration eingesetzt wurde. Dies gewährleistete konstante Messbedingungen. Abweichungen in den Inkubationsbedingungen zu den Wachstumsexperimenten waren die Anaerobisierung der Kulturen mit Helium und der Einsatz eines Rührfisches. Das erwartete Produkt der N<sub>2</sub>O-Reduktion durch cNosZ in *Wolinella succinogenes* ist N<sub>2</sub>. Daher wurden die Kulturen mit Helium anaerobisiert, um eine Detektion des gebildeten N<sub>2</sub> zu ermöglichen. Der Einsatz eines Rührfisches während der gesamten Inkubationszeit sichert die gleichmäßige Durchmischung der Flüssigphase mit der Gasphase und ist daher unverzichtbar. Es konnte kein Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *W. succinogenes* durch die Anaerobisierung mit Helium oder die Verwendung eines Rührfisches detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

#### 4.1.1. Analyse des Gasprofils mit Medium ohne Zugabe von Zellen

Für die Identifikation möglicher Hintergrundsignale, welche von dem eingesetzten Komplexmedium (mit 0,5% Brain-Heart Infusion supplementiertes Medium; Kapitel 3.2.1.) stammen, wurden zunächst Kontrollexperimente mit allen angedachten Varianten des Nitrat-haltigen Mediums durchgeführt. Die Anaerobisierung der Inkubationsgefäße erfolgte 24 h vor dem Start der Messungen, um die Diffusion des verbliebenen  $N_2$  aus dem Medium zu gewährleisten, da es sonst im Verlauf der Messung zu einem Anstieg kommen würde (persönliche Mitteilung Daniel Mania). Der Messzeitraum betrug insgesamt 48 h. In allen drei Varianten des Mediums lässt sich punktuell NO mit einer maximalen Konzentration von 1,7 nmol im Inkubationsgefäß nachweisen (Abb. 8).  $N_2O$  wurde in keiner der Messreihen detektiert. Im Gegensatz dazu konnte  $N_2$  immer detektiert werden. Die Anreicherung ist in allen drei Mediums-Varianten vergleichbar und weist eine Konzentration von etwa  $0,5 \mu\text{mol}$  je Inkubationsgefäß nach 48 h auf.

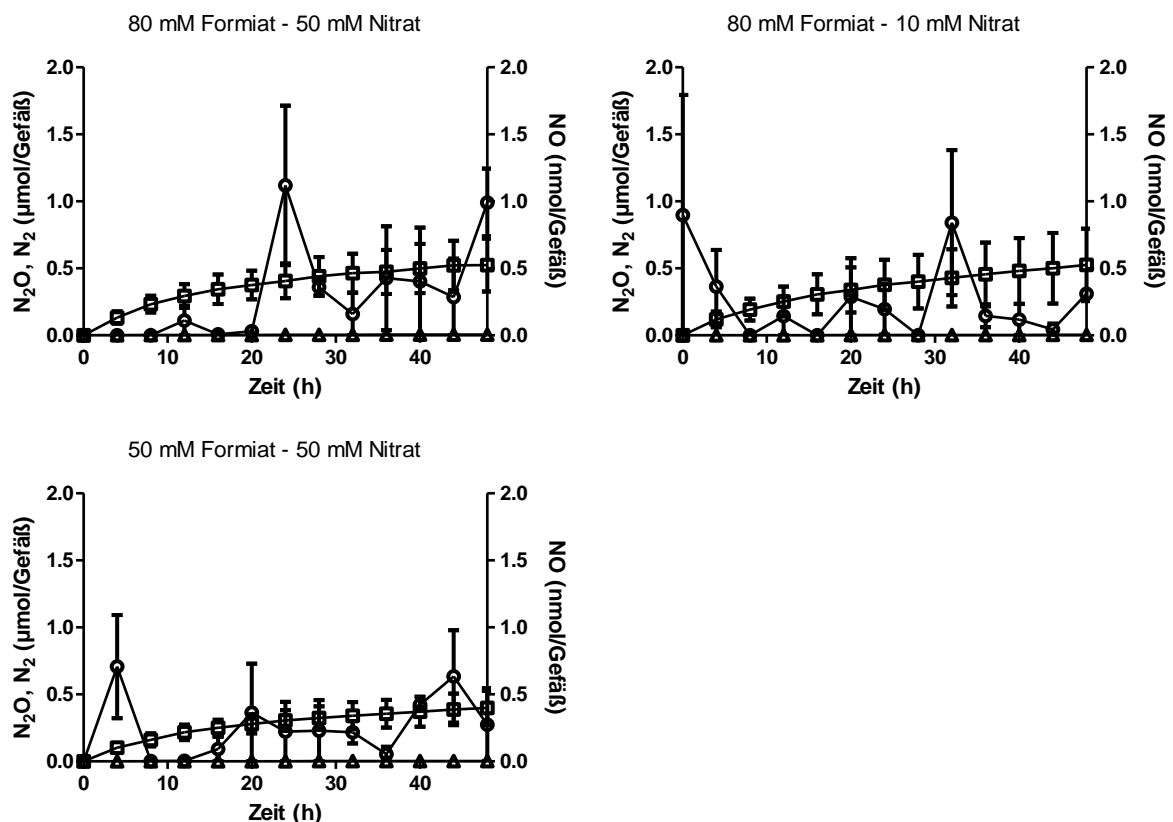


Abb. 8: Nitrat-haltiges Medium ohne Zellen, welches mit 0,5% Brain-Heart Infusion supplementiert wurde (Dreifachbestimmung mit Standardabweichung). ( $\square$ ):  $N_2$ -Konzentration im Inkubationsgefäß ( $\mu\text{mol}$  je Gefäß), ( $\circ$ ): NO-Konzentration im Inkubationsgefäß (nmol je Gefäß), ( $\Delta$ ):  $N_2O$ -Konzentration im Inkubationsgefäß ( $\mu\text{mol}$  je Gefäß), Inkubationstemperatur  $37^\circ\text{C}$

Auf Grund der Anreicherung von Nitrit während des Wachstums von *W. succinogenes* in Formiat-limitiertem Medium wurden Kontrollexperimente mit Nitrat-haltigem Medium und

---

definierten Konzentrationen an Nitrit durchgeführt. Dazu wurden dem 80 mM Formiat/50 mM Nitrat-Medium 10 mM, 20 mM oder 30 mM Nitrit hinzugefügt und die Gasentwicklung über einen Zeitraum von 48 h verfolgt (Abb. 9). Die Substanzspektren zeigen eine deutliche Zunahme der NO-Konzentration im Verlauf der Messung bei allen drei zugegebenen Nitrit-Konzentrationen. Innerhalb der ersten 20 h ist der Anstieg der NO-Konzentration sehr schnell und schwächt dann ab. Je mehr Nitrit vorhanden ist, umso steiler ist der Anstieg innerhalb der ersten Stunden. Zum Ende der Messung sind in den Inkubationsgefäßen mit 20 und 30 mM Nitrit 1500 – 1600 nmol NO detektiert worden. Dies ist im Vergleich zu Inkubationsgefäßen mit 10 mM um bis zu 50% mehr NO. Da dieser Prozess auf Grund der Abwesenheit von Zellen nicht auf eine biologische Aktivität zurückgeführt werden kann, handelt es sich um eine chemische Dekomposition. N<sub>2</sub>O wurde in keiner der Messreihen detektiert. Es konnte jedoch in allen Versuchsansätzen N<sub>2</sub> nachgewiesen werden. Die Substanzspektren zeigen bei den drei zugegebenen Nitrit-Konzentrationen eine lineare Zunahme der N<sub>2</sub>-Konzentration auf. Ein Vergleich der drei Graphen in Abb. 9 macht zudem deutlich, dass je mehr Nitrit vorliegt, umso größer ist die gebildete Menge an N<sub>2</sub>. Es liegt demnach eine positive Korrelation zwischen der Nitrit-Konzentration und der entstehenden Menge an N<sub>2</sub> vor.

Des Weiteren wurde Medium mit 80 mM Formiat/50 mM Nitrat ohne Brain-Heart Infusion (BHI) Supplementierung, aber mit definierten Konzentrationen an Nitrit, in Hinblick auf die Gasentwicklung kontrolliert (Abb. 10). Bei allen Messungen konnte ein vergleichbarer linearer Anstieg der NO-Konzentration detektiert werden. Die gemessene Endkonzentration nach 48 h ist etwa 60 nmol je Gefäß und unabhängig von der zugegebenen Menge an Nitrit. Damit besteht kein Zusammenhang zwischen der freigesetzten Menge an NO und den eingesetzten Konzentrationen an Nitrit. Die detektierten 60 nmol je Gefäß entsprechen ungefähr 5% der zuvor gemessenen NO-Mengen im Medium mit BHI Supplementierung, welche mit bis zu 1600 nmol je Gefäß (Abb. 9) zum größten Teil auf eine Reaktion von Bestandteilen des BHI Zusatzes mit dem Nitrit zurückzuführen ist. Woher das in Abb. 10 gezeigte Stickstoffmonoxid kommt, lässt sich nicht genau definieren. Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind diese geringen Konzentrationen ebenfalls ein Produkt der chemischen Dekomposition des Nitrits mit Bestandteilen des Nitrat-haltigen Mediums. N<sub>2</sub>O wurde in keiner der Messreihen detektiert. Eine positive Korrelation zwischen der zugegebenen Konzentration an Nitrit und der entstehenden Menge an N<sub>2</sub> lässt sich auch in diesem Ansatz nachweisen. Dabei sind die detektierten Werte an N<sub>2</sub> vergleichbar mit dem zuvor supplementierten Medium (vergleiche Abb. 9 und 10). Eine Steigerung der N<sub>2</sub>-Konzentration durch die Zugabe von BHI ist nicht zu erkennen.

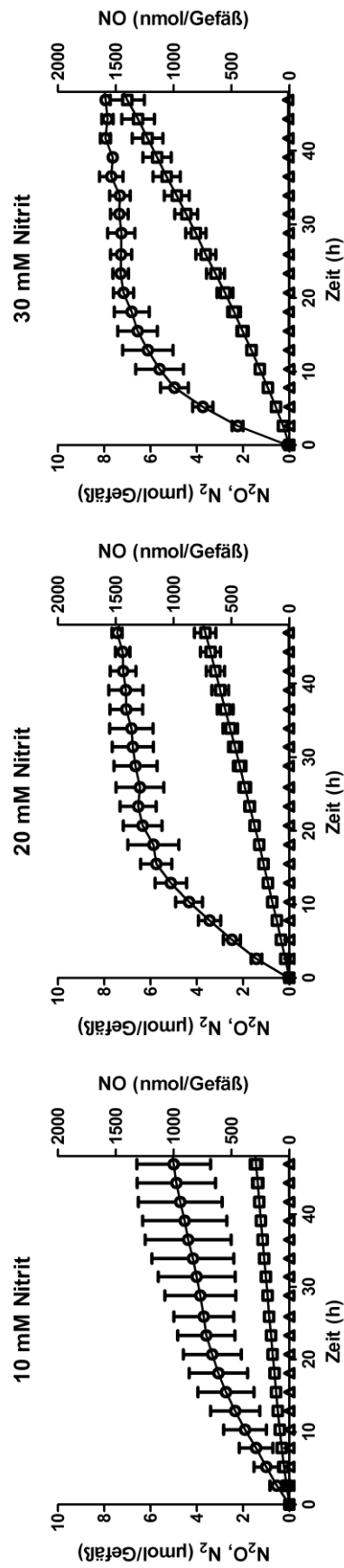


Abb. 9: 80 mM Formiat/50 mM Nitrat-Medium ohne Zellen, welches mit 0,5% Brain-Heart Infusion und mit den angegebenen Mengen Nitrit supplementiert wurde (Dreifachbestimmung mit Standardabweichung). ( $\square$ ):  $N_2$ -Konzentration in dem Inkubationsgefäß ( $\mu\text{mol je Gefäß}$ ), ( $\circ$ ):  $NO$ -Konzentration in dem Inkubationsgefäß (nmol je Gefäß), ( $\Delta$ ):  $N_2O$ -Konzentration in dem Inkubationsgefäß ( $\mu\text{mol je Gefäß}$ ), Inkubationstemperatur  $37^\circ\text{C}$

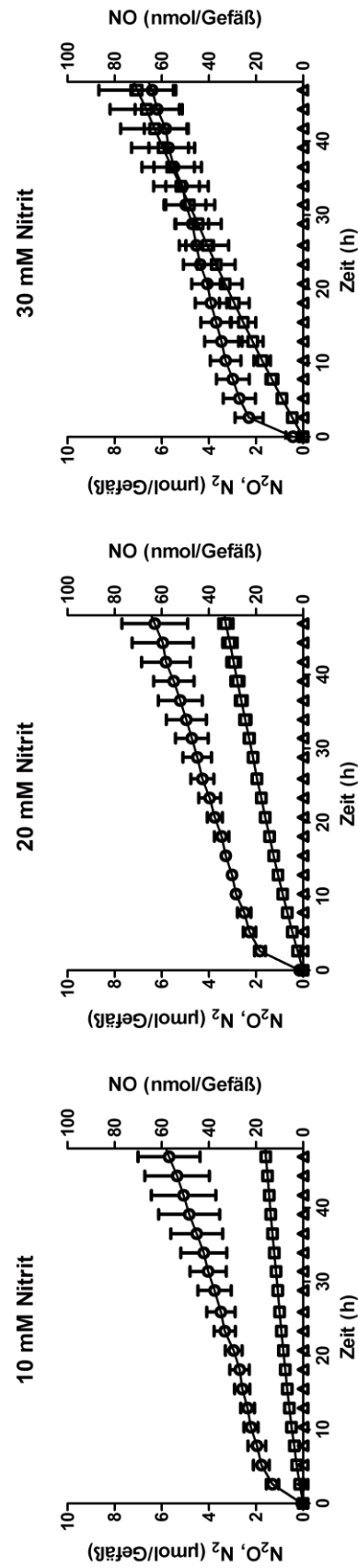


Abb. 10: 80 mM Formiat/50 mM Nitrat-Medium ohne Zellen, welches mit angegebenen Mengen Nitrit supplementiert wurde (Dreifachbestimmung mit Standardabweichung). ( $\square$ ):  $N_2$ -Konzentration in dem Inkubationsgefäß ( $\mu\text{mol je Gefäß}$ ), ( $\circ$ ):  $NO$ -Konzentration in dem Inkubationsgefäß (nmol je Gefäß), ( $\Delta$ ):  $N_2O$ -Konzentration in dem Inkubationsgefäß ( $\mu\text{mol je Gefäß}$ ), Inkubationstemperatur  $37^\circ\text{C}$

---

#### 4.1.2. Charakterisierung von *W. succinogenes* Wildstamm, *W. succinogenes* komp<sub>P<sub>nos</sub></sub>*nosZ* und *W. succinogenes* $\Delta$ *nosZ* in Nitrat-reichen Medien

*W. succinogenes* Wildstamm, *W. succinogenes* komp<sub>P<sub>nos</sub></sub>*nosZ* und *W. succinogenes*  $\Delta$ *nosZ* wurden zunächst wie beschrieben (Kapitel 3.3.1.) in Nitrat-haltigem Medium (80 mM Formiat/50 mM Nitrat) kultiviert. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte bis zum Erreichen der stationären Phase jede Stunde. Alle drei Stämme wiesen vergleichbare Verdopplungszeiten von  $1,60 \pm 0,13$  h und finale optische Dichten bei einer Wellenlänge von 578 nm von 0,6 - 0,7 auf (Abb. 11 obere Reihe).

Der Nachweis der Cytochrom *c* N<sub>2</sub>O-Reduktase (cNosZ) in den Kulturen aller drei *W. succinogenes* Stämme erfolgte mittels Hämfärbung. Hierfür wurde in der spätexponentiellen Wachstumsphase eine Probe aus der jeweiligen Kultur entnommen und wie beschrieben mittels SDS-PAGE hinsichtlich der Größe aufgetrennt und anschließend gefärbt (Kapitel 3.6.6.). Die Detektion der Cytochrom *c* N<sub>2</sub>O-Reduktase war weder in Zellen von *W. succinogenes* Wildstamm noch in Zellen von *W. succinogenes*  $\Delta$ *nosZ* möglich. Dies entspricht auch der Erwartung, da das cNosZ kodierende Gen in *W. succinogenes* Wildstamm durch ein Insertionselement (IS1302) unterbrochen und inaktiviert wird. Ein entsprechendes Signal bei der erwarteten Größe von 95 kDa war hingegen in Zellen von *W. succinogenes* komp<sub>P<sub>nos</sub></sub>*nosZ* nachweisbar (Abb. 11 untere Reihe).

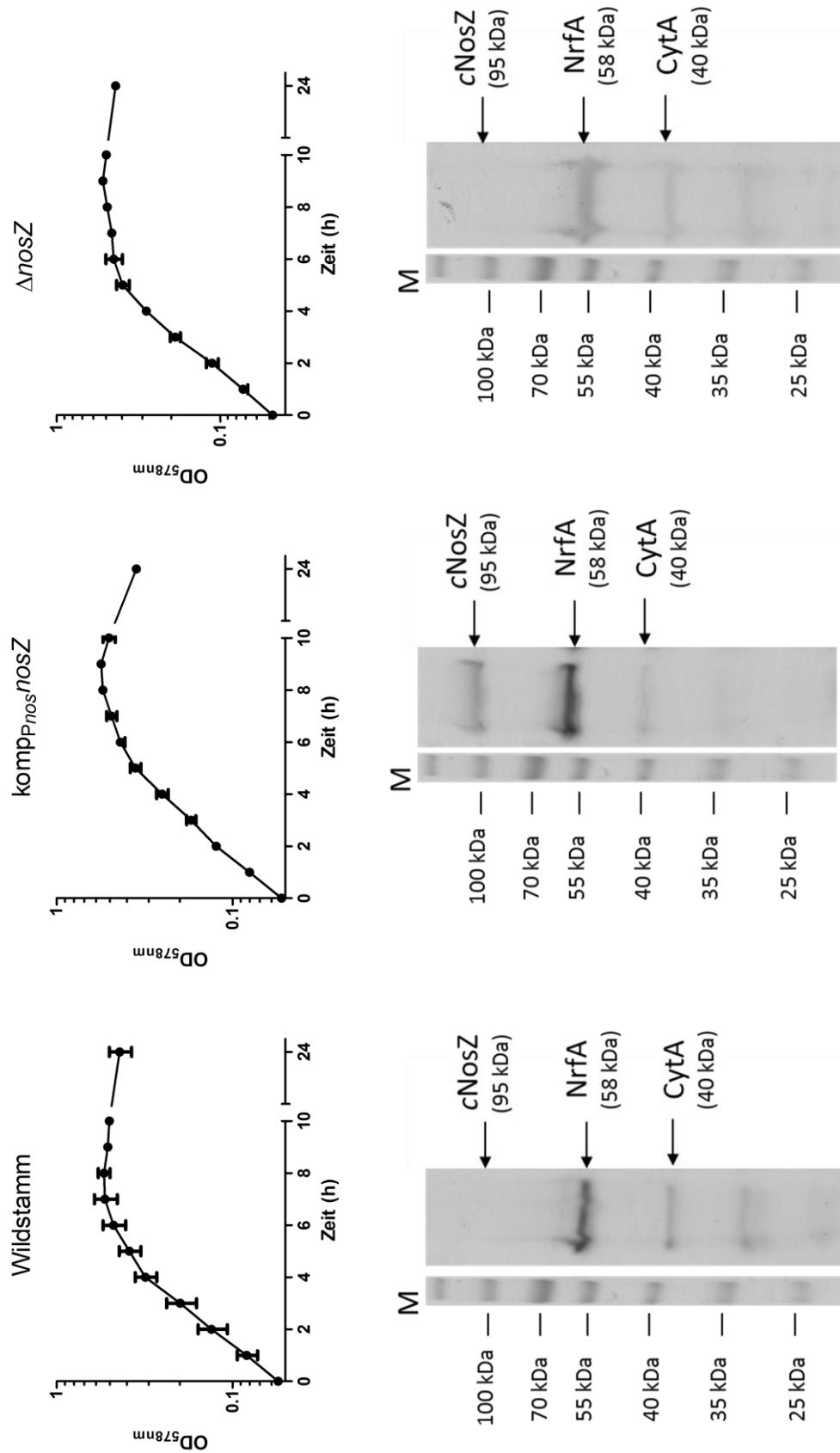


Abb. 11: *W. succinogenes* Stämme in 80 mM Formiat/50 mM Nitrat-Medium, welches mit 0,5 % Brain-Heart Infusion supplementiert wurde; Inkubationstemperatur 37 °C; obere Reihe: Wachstumskurven; Dreifachbestimmung mit Standardabweichung; untere Reihe: Detektion von *cNosZ* und *NrfA* mittels Hämifärbung; Ernte der Zellen in der spätexponentiellen Phase, 100 µg Gesamtprotein pro Spur, 10 % SDS-Polyacrylamidgel; links: *W. succinogenes* Wildstamm; Mitte: *W. succinogenes* komp<sub>P<sub>nos</sub></sub>/nosZ; rechts: *W. succinogenes* ΔnosZ



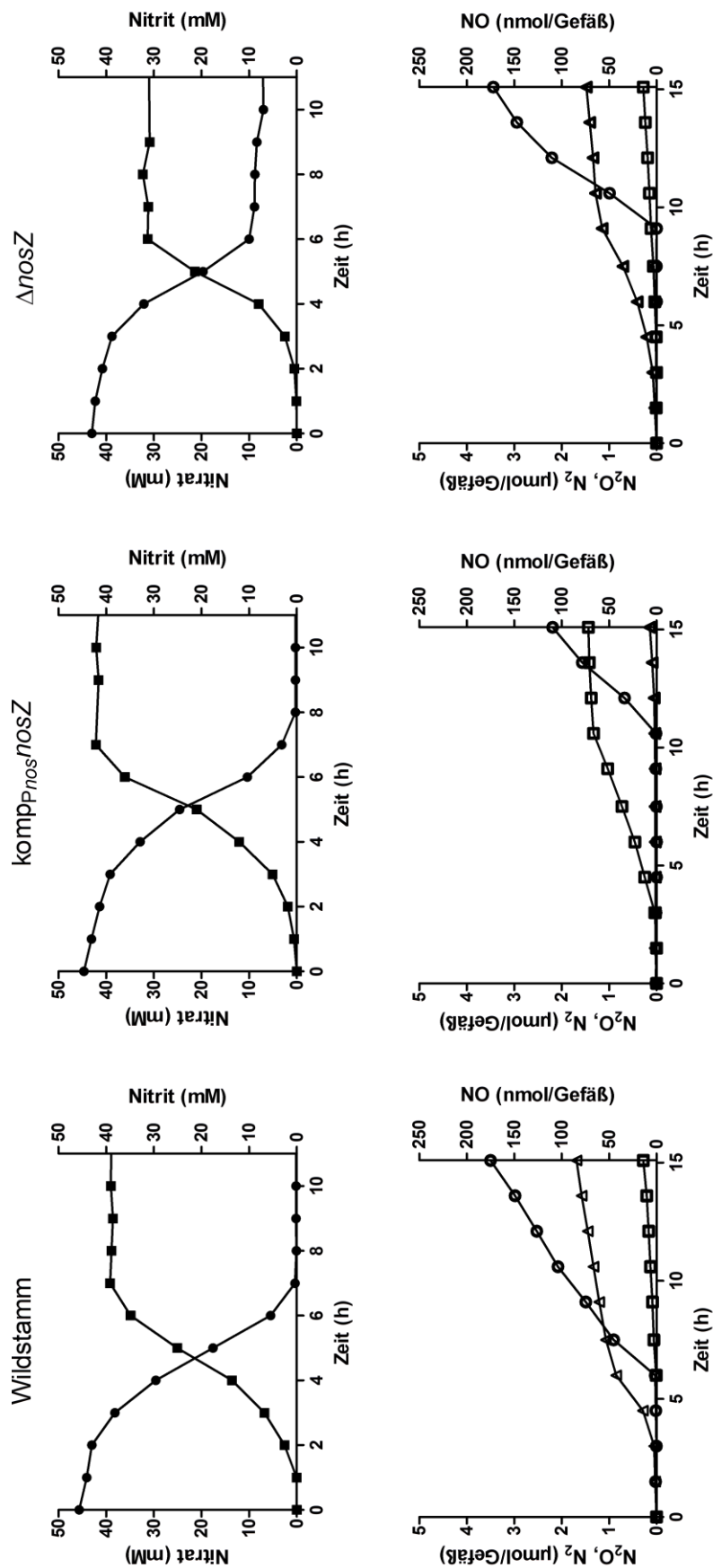


Abb. 12: *W. succinogenes* Stämme in 80 mM Formiat/50 mM Nitrat-Medium, welches mit 0,5 % Brain-Heart Infusion supplementiert wurde. Inkubationstemperatur 37 °C; links: *W. succinogenes* Wildstamm; Mitte: *W. succinogenes* komp<sub>P<sub>nos</sub></sub>nosZ; rechts: *W. succinogenes* ΔnosZ; exemplarisch ist eine von drei Messreihen dargestellt; obere Reihe: Substanzspektrum von *W. succinogenes* Stämmen; Nitrat (●) in mM, Nitrit (■) in mM; untere Reihe: Substanzspektrum von *W. succinogenes* Stämmen (□): N<sub>2</sub>-Konzentration in dem Inkubationsgefäß (μmol je Gefäß), (○): NO-Konzentration in dem Inkubationsgefäß (nmol je Gefäß), (Δ): N<sub>2</sub>O-Konzentration in dem Inkubationsgefäß (μmol je Gefäß)

---

Zur weiteren Charakterisierung der genannten *W. succinogenes* Stämme wurden die Proben der Wachstumsmessung zur Bestimmung der Nitrat- und Nitritumsätze verwendet (Kapitel 3.6.1. und 3.6.2.). In Abb. 12 obere Reihe ist exemplarisch eine von drei Messreihen graphisch dargestellt. Während bei Zellen von *W. succinogenes* Wildstamm und *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>nosZ das Nitrat mit dem Erreichen der stationären Phase nach 7 - 8 h aufgebraucht ist, verbleibt in Kulturen mit *W. succinogenes* ΔnosZ eine Restkonzentration von 5 - 6 mM. Parallel zum Absinken der Konzentration an Nitrat ist die Akkumulation von Nitrit in allen Kulturen zu detektieren. Dass eine Konzentration von 45 mM Nitrit zu keinem Zeitpunkt der Messung nachgewiesen wurde, liegt vermutlich an der gleichzeitigen Umsetzung eines Teils des Nitrits zu Ammonium (Bokranz *et al.*, 1983; Lorenzen *et al.*, 1993).

Die Ergebnisse der Analysen der Gaskomponenten Stickstoffmonoxid (NO), Distickstoffmonoxid (N<sub>2</sub>O) und Stickstoff (N<sub>2</sub>) in den Kulturen ist in Abb. 12 (untere Reihe) zusammengefasst. Exemplarisch ist eine von mindestens drei durchgeführten Messreihen graphisch dargestellt. Ein Vergleich der drei Stämme zeigt auf, dass Kulturen mit *W. succinogenes* Wildstamm und *W. succinogenes* ΔnosZ ein ähnliches Substanzspektrum aufweisen. Der lineare Anstieg des N<sub>2</sub> korreliert mit der Akkumulation von Nitrit und ist demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die zuvor beschriebene chemische Dekomposition zurückzuführen (Kapitel 4.1.1.). Hingegen weisen die Kulturen beider *W. succinogenes* Stämme nach Erreichen der stationären Phase ähnliche N<sub>2</sub>O-Konzentrationen im Bereich von 1,0 - 1,3 μmol je Gefäß auf. In Kulturen mit *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>nosZ wurde mit Beendigung des Wachstums nach 10 h N<sub>2</sub> detektiert (1,5 μmol je Gefäß). Die nachgewiesene Konzentration an N<sub>2</sub> korrespondiert mit der ermittelten N<sub>2</sub>O Konzentration in *W. succinogenes* Wildstamm und *W. succinogenes* ΔnosZ. Eine signifikante Akkumulation an N<sub>2</sub>O konnte in *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>nosZ Kulturen nicht detektiert werden. Demzufolge ist *W. succinogenes* in der Lage N<sub>2</sub>O unter ammonifizierenden Bedingungen zu produzieren und dieses mittels einer intakten N<sub>2</sub>O-Reduktase zu N<sub>2</sub> umzusetzen. In allen drei Kulturen sind der Zeitpunkt der Bildung sowie die Menge an freigesetztem NO verschieden. Dies entspricht im Wesentlichen den Beobachtungen, die bei den Kontrollexperimenten gemacht wurden (Kapitel 4.1.1.), kann aber auch auf Unterschiede innerhalb der Kulturen zurückzuführen sein. Eine Erklärung ist die unterschiedliche Menge an BHI, welche ursprünglich in den Inokulationskulturen vorhanden war. Da alle Messungen bei einer OD<sub>578nm</sub> von 0,05 starten sollten, kam es zu Variationen im Inokulationsvolumen (1,5 - 2,0 ml) und demnach auch in den Mengen des eingebrachten, teils verwerteten BHI. Vorstellbar ist auch eine Latenzphase in einigen Kulturen. Eine Überprüfung der optischen Dichte in den analysierten Kulturen

---

selbst erfolgte nicht, um die Analyse der Gase nicht zu verfälschen. Als Kontrolle wurden jedoch Kulturen, welche mit derselben Vorkultur inokuliert wurden, hinsichtlich der optischen Dichte nach 2 h kontrolliert. Eine Latenzphase wurde hier nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Die Kultivierung von *W. succinogenes* Wildstamm, *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>nosZ und *W. succinogenes* ΔnosZ in Medium mit 50 mM Formiat/50 mM Nitrat erfolgte wie zuvor beschrieben (Kapitel 3.3.1.). Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte bis zum Erreichen der stationären Phase jede Stunde. Die Stämme zeigten ein identisches Wachstumsverhalten, gemessen an der Entwicklung der OD<sub>578nm</sub> über einen Zeitraum von 24 h (Abb. 13 obere Reihe). Der Vergleich von Kulturen mit *W. succinogenes* Wildstamm und *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>nosZ bezüglich des Umsatzes an Nitrat und Nitrit wies keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 13 untere Reihe). Die Reduktion von Nitrat ist nach 7 h vermutlich auf Grund des verbrauchten Elektronendonors Formiat beendet und es verbleibt eine Restkonzentration von 5 - 10 mM. Zu diesem Zeitpunkt hat sich Nitrit in einer Konzentration von 30 - 35 mM akkumuliert. Die Differenz von einigen mM zu der eingesetzten Konzentration an Nitrat ergibt sich vermutlich aus der parallelen Umsetzung eines Teils des Nitrits zu Ammonium (Bokranz *et al.*, 1983; Lorenzen *et al.*, 1993). Kulturen mit *W. succinogenes* ΔnosZ wiesen im Gegensatz zu den beiden anderen Stämmen einen verlangsamten Umsatz von Nitrat zu Nitrit auf und es verblieb eine Restkonzentration von 15 mM nach 8 h. Diese Diskrepanz lässt sich nicht im Wachstum detektieren. Alle drei Stämme wiesen vergleichbare Verdopplungszeiten von  $1,65 \pm 0,09$  h und finale optische Dichten bei einer Wellenlänge von 578 nm von 0,5 auf (Abb. 13 obere Reihe).

Die Analyse der Produktion und des Verbrauches der Gase NO, N<sub>2</sub>O und N<sub>2</sub> in ersten Versuchen (Messung alle 4 h über einen Zeitraum von 48 h; Daten nicht gezeigt) ergab ein ähnliches Substanzspektrum wie im Medium mit 80 mM Formiat/50 mM Nitrat (Abb. 12 untere Reihe). Kulturen mit *W. succinogenes* Wildstamm und *W. succinogenes* ΔnosZ produzierten im vergleichbaren Maß N<sub>2</sub>O (1,1-1,3 μmol innerhalb von 12 h), während in Kulturen mit *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>nosZ anstelle von N<sub>2</sub>O die entsprechende Menge an N<sub>2</sub> zu detektieren war. Auf Grund der vergleichbaren Konzentration an akkumuliertem Nitrit während des Wachstums in beiden Medien war auch der Umfang an gebildetem NO mit maximal 250 nmol pro Gefäß ähnlich. Ein signifikanter Unterschied im Substanzspektrum der beiden Nitrat-reichen Medien (80 mM Formiat/50 mM Nitrat, 50 mM Formiat/50 mM Nitrat) konnte bei keinem der drei Stämme gemessen werden.

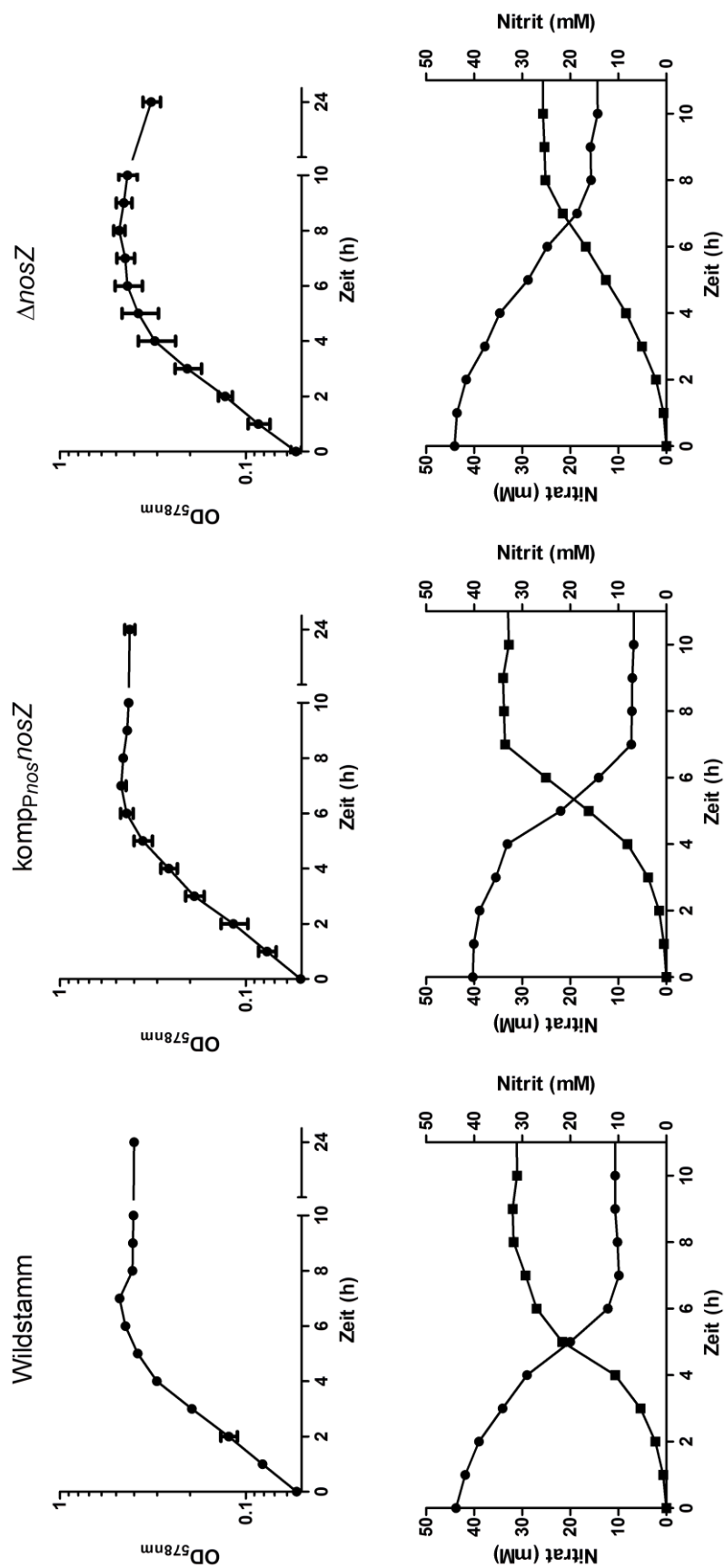


Abb. 13: *W. succinogenes* Stämme in 50 mM Formiat/50 mM Nitrat-Medium, welches mit 0,5 % Brain-Heart Infusion supplementiert wurde. Inkubationstemperatur 37 °C; obere Reihe: Wachstumskurven, Dreifachbestimmung mit Standardabweichung; untere Reihe: Substanzspektrum; Nitrat (●) in mM, Nitrit (■) in mM; exemplarisch ist eine von drei Messreihen dargestellt; links: *W. succinogenes* Wildstamm; Mitte: *W. succinogenes kompP<sub>nos</sub>ΔnosZ*; rechts: *W. succinogenes ΔnosZ*

---

#### 4.1.3. Charakterisierung von *W. succinogenes* Wildstamm, *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>*nosZ* und *W. succinogenes* $\Delta$ *nosZ* in Nitrat-limitiertem Medium

*W. succinogenes* Wildstamm, *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>*nosZ* und *W. succinogenes*  $\Delta$ *nosZ* wurden zunächst wie beschrieben (Kapitel 3.3.1.) in Nitrat-haltigem Medium (80 mM Formiat/10 mM Nitrat) kultiviert. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte bis zum Erreichen der stationären Phase jede Stunde. Unterschiede im Wachstum der drei Stämme waren nicht zu erkennen. Alle Kulturen wiesen vergleichbare Verdopplungszeiten mit  $1,52 \pm 0,17$  h und finale optische Dichten bei einer Wellenlänge von 578 nm von 0,4 – 0,5 auf (Abb. 14 obere Reihe).

Der Nachweis der Cytochrom *c* N<sub>2</sub>O-Reduktase (cNosZ) in den Kulturen aller drei Stämme erfolgte mittels Hämfärbung. Hierfür wurde in der spätexponentiellen Wachstumsphase eine Probe aus der jeweiligen Kultur entnommen und wie beschrieben mittels SDS-PAGE hinsichtlich der Größe aufgetrennt und anschließend gefärbt (Kapitel 3.6.6.). Eine Detektion von cNosZ mittels Hämfärbung war weder in Zellen von *W. succinogenes* Wildstamm noch in Zellen von *W. succinogenes*  $\Delta$ *nosZ* möglich. Dies entspricht auch der Erwartung, da das cNosZ kodierende Gen in *W. succinogenes* Wildstamm durch ein Insertionselement (IS1302) unterbrochen und inaktiviert ist. Lediglich in Zellen der Komplementationsmutante *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>*nosZ* war ein entsprechendes, aber schwaches Signal bei der erwarteten Größe von 95 kDa nachweisbar (Abb. 14 untere Reihe).

Der Vergleich der drei Stämme zeigt keine nennenswerten Unterschiede im Nitrat- und Nitritumsatz auf (Abb. 15 obere Reihe). Bedingt durch den parallelen Verbrauch von Nitrat und Nitrit ist lediglich eine Nitritakkumulation bis zu einer Konzentration von 5 mM messbar, welches durch die Cytochrom *c* Nitritreduktase (NrfA) zu Ammonium umgesetzt wird (Bokranz *et al.*, 1983; Lorenzen *et al.*, 1993; Simon, 2002). Bereits nach 5 - 6 h ließ sich kein Elektronenakzeptor mehr nachweisen und die Zellen traten in die stationäre Phase ein, während dies in Formiat-limitierten/Nitrat-reichen Medien (80 mM Formiat/50 mM Nitrat) erst nach 7 - 8 h geschah (Abb. 12 obere Reihe). Aus dieser Limitierung an Elektronenakzeptor resultierte auch eine maximale OD<sub>578nm</sub> von 0,5.

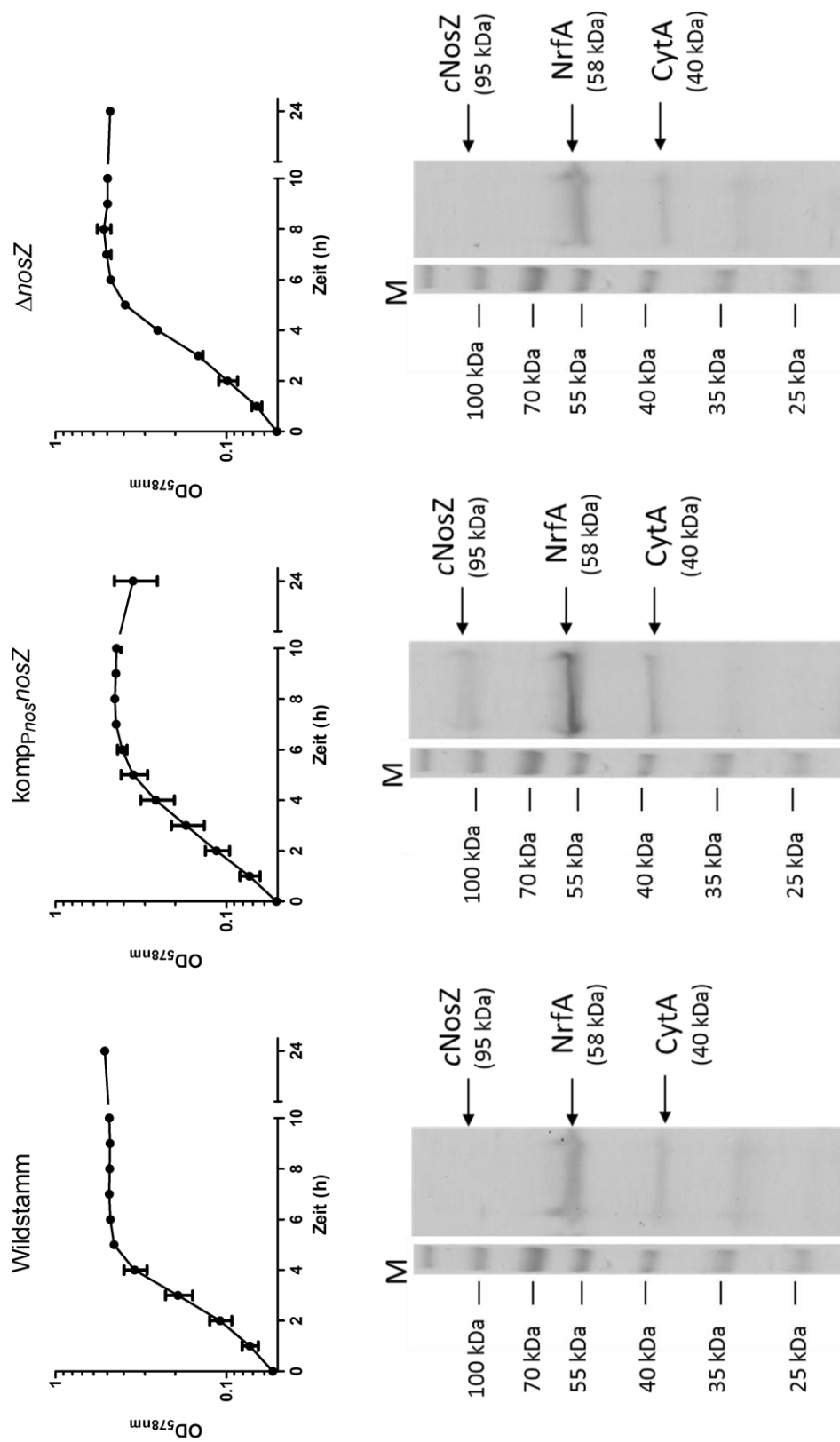


Abb. 14: *W. succinogenes* Stämme in 80 mM Formiat/10 mM Nitrat-Medium, welches mit 0,5 % Brain-Heart Infusion supplementiert wurde. Inkubationstemperatur 37 °C; obere Reihe: Wachstumskurven, Dreifachbestimmung mit Standardabweichung; untere Reihe: Detektion von cNosZ und Nrfa mittels Hämefärbung; Ernte der Zellen in der spätexponentiellen Phase, 100 µg Gesamtprotein pro Spur, 10 % SDS-Polyacrylamidgel; links: *W. succinogenes* Wildstamm Mitte: *W. succinogenes* kompP<sub>nos</sub>/nosZ; rechts: *W. succinogenes* ΔnosZ; Nrfa: Cytochrom c Nitritreduktase; CytA: Membran-gebundenes Cytochrom unbekannter Funktion (Kern *et al.*, 2010)

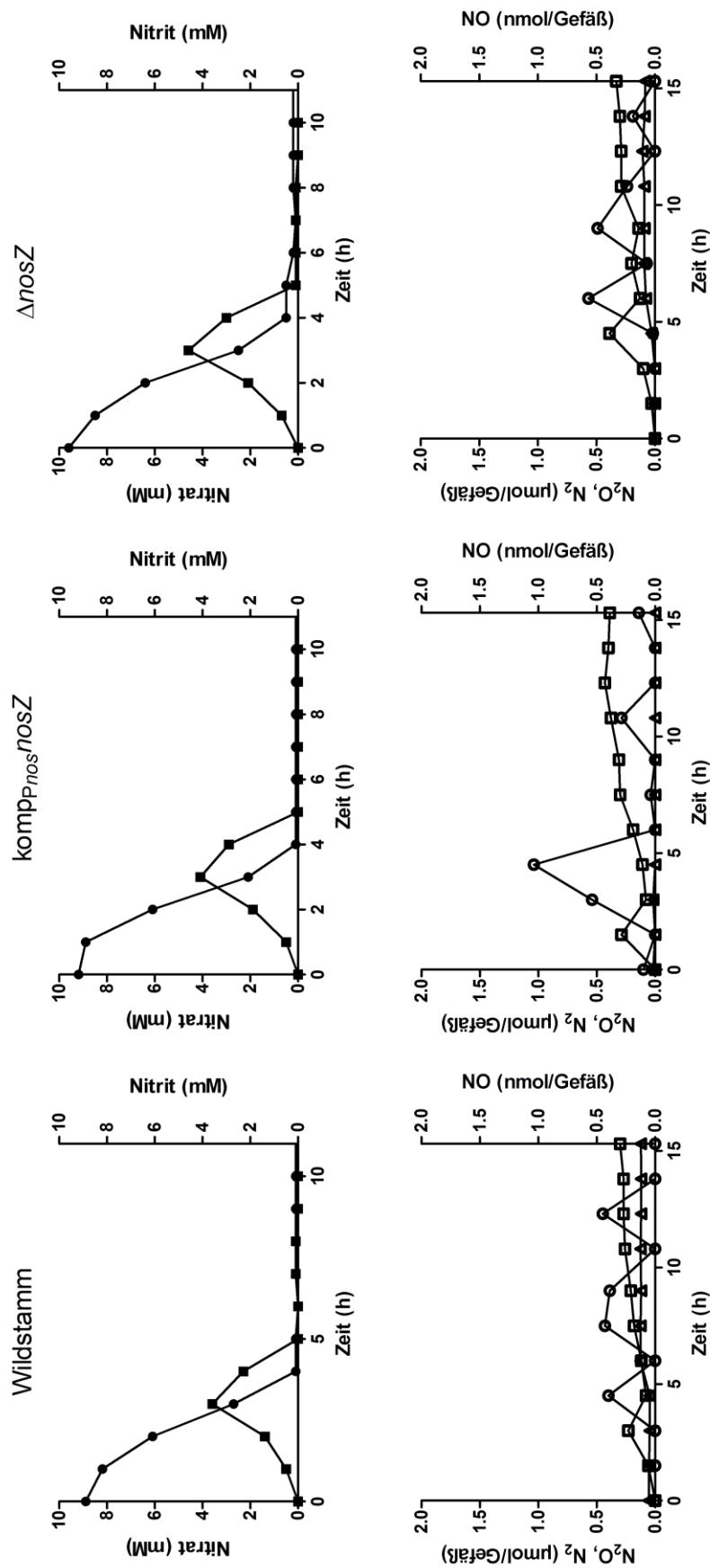


Abb. 15: *W. succinogenes* Stämme in 80 mM Formiat/10 mM Nitrat-Medium, welches mit 0,5 % Brain-Heart Infusion supplementiert wurde. Inkubationstemperatur 37 °C; exemplarisch ist eine von drei Messreihen dargestellt; links: *W. succinogenes* Wildstamm; Mitte: *W. succinogenes* komppnosZ; rechts: *W. succinogenes* ΔnosZ; obere Reihe: Substanzspektrum von *W. succinogenes* Stämmen; Nitrat (●) in mM, Nitrit (■) in mM; untere Reihe: Substanzspektrum von *W. succinogenes* Stämmen (□): N<sub>2</sub>O-Konzentration im Inkubationsgefäß (μmol je Gefäß), (Δ): N<sub>2</sub>O-Konzentration im Inkubationsgefäß (μmol je Gefäß)

---

Die Analyse der Gasproduktion und des Verbrauches verdeutlicht das Phänomen der Interaktion des akkumulierten Nitrits mit dem Mediums Zusatz BHI. Auf Grund der geringen Menge und der kurzen Zeitspanne, in welcher das Nitrit in diesen Kulturen vorliegt, kommt es zu keiner nennenswerten chemischen Dekomposition und demzufolge ist nur eine vernachlässigbare Konzentration an NO detektierbar (Abb. 15 untere Reihe). Auch N<sub>2</sub>O ließ sich nur in geringen Mengen von 0,1 µmol in der exponentiellen Wachstumsphase in Kulturen mit *W. succinogenes* Wildstamm und mit *W. succinogenes* Δ*nosZ* nachweisen. In Kulturen mit *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>*nosZ* wurde kein N<sub>2</sub>O detektiert aber eine korrespondierende Menge an vermutlich enzymatisch gebildetem N<sub>2</sub>.

#### 4.1.4. Reduktion von externem N<sub>2</sub>O

Die bisherigen gaschromatographischen Analysen zeigen eine Produktion von N<sub>2</sub>O durch *W. succinogenes* Zellen in Formiat-limitierten/Nitrat-reichen Medien auf (Abb. 12 untere Reihe). Mittels eines intakten *nosZ* ist es des Weiteren möglich die Cytochrom c N<sub>2</sub>O-Reduktase auszubilden (Abb. 11 untere Reihe), welche vermutlich das gesamte intern produzierte N<sub>2</sub>O zu N<sub>2</sub> reduziert. Mit dem Ziel der Untersuchung der N<sub>2</sub>O-Reduktionsrate des Enzymes wurden Zellen von *W. succinogenes* Wildstamm, *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>*nosZ* und *W. succinogenes* Δ*nosZ* mit anfänglich 1% N<sub>2</sub>O in den Kulturgefäßen angezogen und das Substanzspektrum hinsichtlich des N<sub>2</sub>O-Verbrauches analysiert (Abb. 16). Als Kontrolle diente Medium ohne Zellen, welches ebenfalls mit N<sub>2</sub>O und zusätzlich mit 30 mM Nitrit versetzt war. Die gewählte Konzentration ergibt sich aus den zuvor bestimmten Substanzumsätzen, bei denen im Durchschnitt 30 – 35 mM Nitrit am Ende des Wachstums akkumulierten. Eine Beeinflussung der N<sub>2</sub>O-Messung durch vorhandenes Nitrit, BHI oder entstandenes NO soll dadurch ausgeschlossen werden. Eine Beeinträchtigung der Gasanalyse durch das zusätzliche N<sub>2</sub>O in den Inkubationsgefäßen wurde nicht beobachtet. Über den gesamten Messzeitraum von 20 h blieb die N<sub>2</sub>O-Konzentration im Inkubationsgefäß, welches als Kontrolle fungierte, konstant (Abb. 16). In Kulturen mit *W. succinogenes* Wildstamm und *W. succinogenes* Δ*nosZ* ließ sich ebenfalls keine signifikante Abnahme an N<sub>2</sub>O detektieren. Jedoch zeigte sich in Kulturen mit *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>*nosZ* eine Abnahme von 10 µmol N<sub>2</sub>O pro Inkubationsgefäß in einem Zeitraum von 10 h (5 - 15 h nach Zugabe des Gases N<sub>2</sub>O), sowie eine korrespondierende Menge an entstandenem N<sub>2</sub> (10 µmol). Die Fähigkeit intern produziertes sowie extern hinzugefügtes N<sub>2</sub>O zu reduzieren ist demnach charakteristisch für *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>*nosZ*. Dennoch wurde nicht das gesamte hinzugefügte Distickstoffmonoxid umgesetzt, es verbleiben weitere 35 - 40 µmol N<sub>2</sub>O im Inkubationsgefäß. Eine mögliche Erklärung könnte die Limitierung durch Formiat sein.



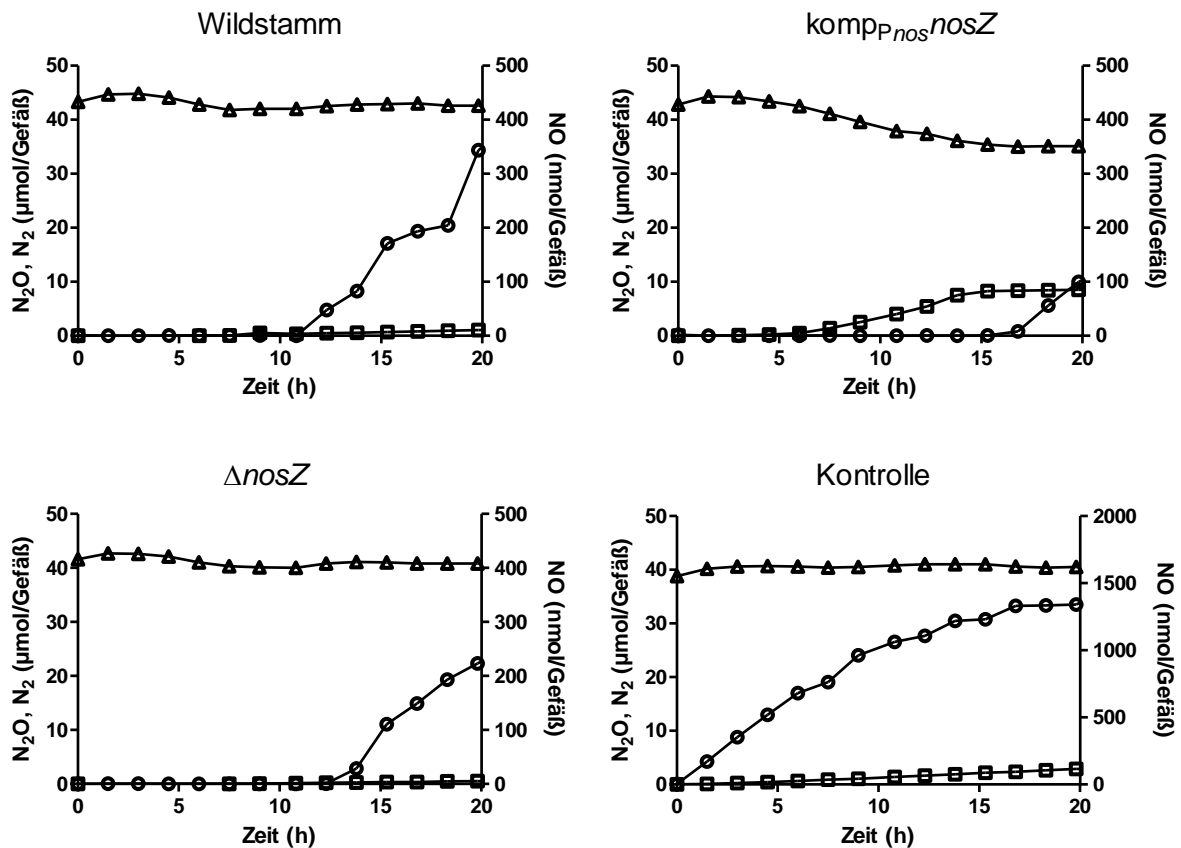


Abb. 16: Substanzspektrum von *W. succinogenes* Stämmen in 80 mM Formiat/50 mM Nitrat-Medium, welches mit 0,5 % Brain-Heart Infusion supplementiert wurde sowie mit 1% N<sub>2</sub>O. Exemplarisch ist eine von drei Messreihen dargestellt; (□): N<sub>2</sub>-Konzentration im Inkubationsgefäß (μmol je Gefäß), (○): NO-Konzentration im Inkubationsgefäß (nmol je Gefäß), (Δ): N<sub>2</sub>O-Konzentration im Inkubationsgefäß (μmol je Gefäß), Inkubationstemperatur 37 °C; Kontrolle: Medium ohne Zellen mit 30 mM Kaliumnitrit

Um die Limitierung des N<sub>2</sub>O-Umsatzes durch Formiat auszuschließen, wurden Zellen von *W. succinogenes* Wildstamm, *W. succinogenes* komp<sub>P<sub>nos</sub></sub>nosZ und *W. succinogenes* ΔnosZ mit anfänglich 1% N<sub>2</sub>O im Medium mit 80 mM Formiat und 10 mM Nitrat vermehrt und das Substanzspektrum hinsichtlich des N<sub>2</sub>O-Verbrauches analysiert (Abb. 17). Als Kontrolle diente wieder Medium ohne Zellen, welches ebenfalls mit N<sub>2</sub>O und zusätzlich mit 10 mM Nitrit versetzt war. Eine Beeinträchtigung der Gasanalyse durch das zusätzliche N<sub>2</sub>O in den Inkubationsgefäßen wurde auch in diesem Versuchsansatz nicht beobachtet. Wie zu erwarten war, konnte in Kulturen mit *W. succinogenes* Wildstamm und *W. succinogenes* ΔnosZ keine signifikante Abnahme an N<sub>2</sub>O gemessen werden. Überraschenderweise fiel jedoch auch der Verbrauch mit 0,5 μmol N<sub>2</sub>O pro Inkubationsgefäß in einem Zeitraum von 10 h (5 - 15 h nach Zugabe des Gases N<sub>2</sub>O) in Kulturen mit *W. succinogenes* komp<sub>P<sub>nos</sub></sub>nosZ im Vergleich zum vorangegangenen Experiment deutlich geringer aus. Das bedeutet, dass trotz Verfügbarkeit von Elektronendonator und -akzeptor, die Umsatzrate der N<sub>2</sub>O-Reduktase signifikant geringer ist als in einem Medium mit einem Überschuss an Akzeptor.

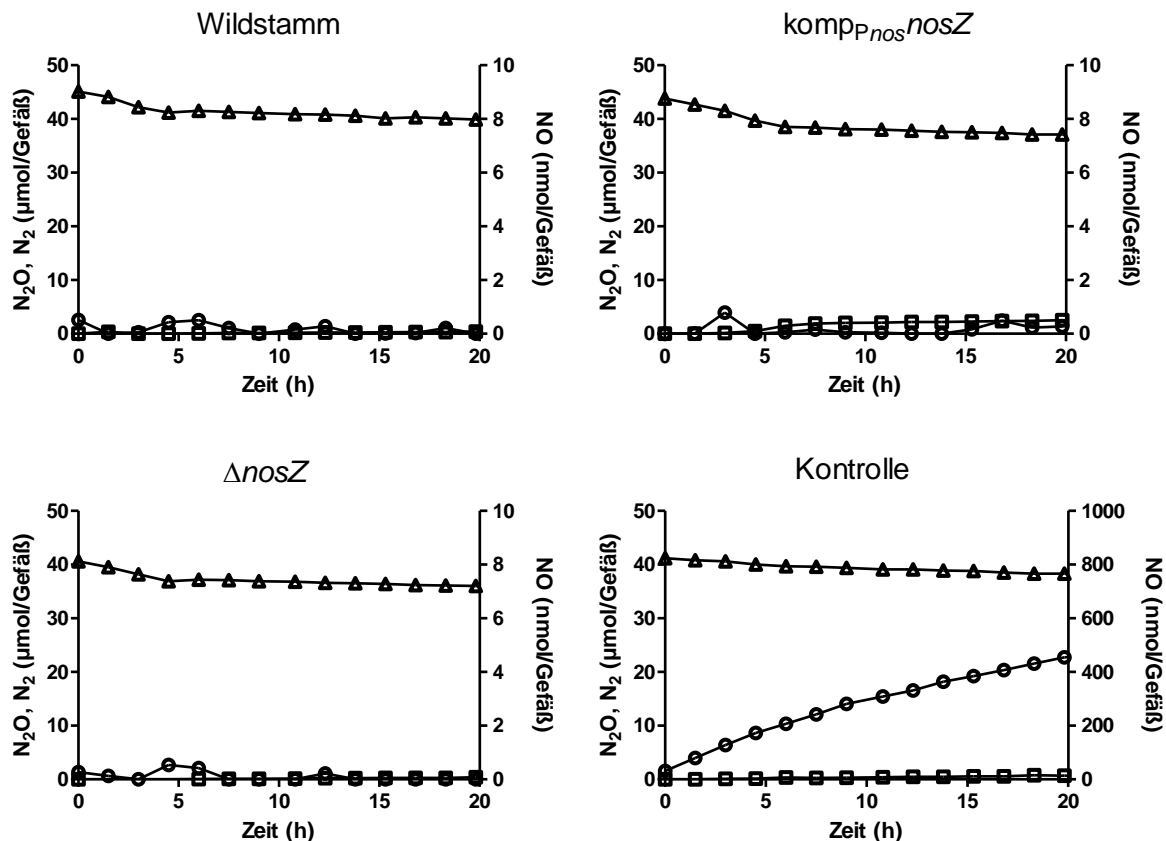


Abb. 17: Substanzspektrum von *W. succinogenes* Stämmen in 80 mM Formiat/10 mM Nitrat-Medium, welches mit 0,5 % Brain-Heart Infusion sowie mit 1% N<sub>2</sub>O supplementiert wurde. Exemplarisch ist eine von drei Messreihen dargestellt; (□): N<sub>2</sub>-Konzentration im Inkubationsgefäß (μmol je Gefäß), (○): NO-Konzentration im Inkubationsgefäß (nmol je Gefäß), (Δ): N<sub>2</sub>O-Konzentration im Inkubationsgefäß (μmol je Gefäß), Inkubationstemperatur 37 °C; Kontrolle: Medium ohne Zellen mit 10 mM Kaliumnitrit

#### 4.1.5. Inhibierung der N<sub>2</sub>O-Reduktase mittels Acetylen

Acetylen ist ein bekannter Inhibitor für die N<sub>2</sub>O-Reduktase und fand bereits bei früheren Experimenten zur Untersuchung der Funktion von cNosZ in *W. succinogenes* Anwendung (Payne *et al.*, 1982; Yoshinari, 1980). Basierend auf den Ergebnissen mit dem 80 mM Formiat/50 mM Nitrat-Medium, in dem der bisher höchste Verbrauch von N<sub>2</sub>O nachgewiesen werden konnte, wurde dieses für den Inhibitionsversuch gewählt. Für die phänotypische Charakterisierung wurden 10% der Gasphase des Inkubationsgefäßes gegen Acetylen ausgetauscht und jeweils mit Zellen von *W. succinogenes* Wildstamm, *W. succinogenes* komp<sub>Pnos</sub>nosZ und *W. succinogenes* ΔnosZ inokuliert (Abb. 18). Als Kontrolle diente Medium ohne Zellen, welches ebenfalls mit Acetylen und zusätzlich mit 30 mM Nitrit versetzt war. Die Detektion der Gase NO, N<sub>2</sub>O und N<sub>2</sub> wurde durch die Anwesenheit des Inhibitors nicht beeinflusst. Die lineare Zunahme der N<sub>2</sub>-Konzentration wie sie im Kontrollansatz und in Kulturen mit Zellen von *W. succinogenes* Wildstamm nach 8 h zu beobachten war, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine chemische Reaktion im Medium zurückzuführen (Abb. 9).

In den Kulturen mit *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>nosZ und *W. succinogenes* ΔnosZ ließ sich nach 16 h ebenfalls die Zunahme der N<sub>2</sub>-Konzentration detektieren (Daten nicht gezeigt). Der Vergleich der Substanzspektren aller drei Stämme zeigt deutlich einen Anstieg in der N<sub>2</sub>O-Konzentration, vergleichbar mit den Spektren von Abb. 12 für *W. succinogenes* Wildstamm und *W. succinogenes* ΔnosZ. Die Detektion von N<sub>2</sub> in der Kultur mit *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>nosZ war im Vergleich zu vorhergehenden Experimenten jedoch nicht möglich. Dies liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit an der vollständigen Inaktivierung der N<sub>2</sub>O-Reduktase durch Acetylen.

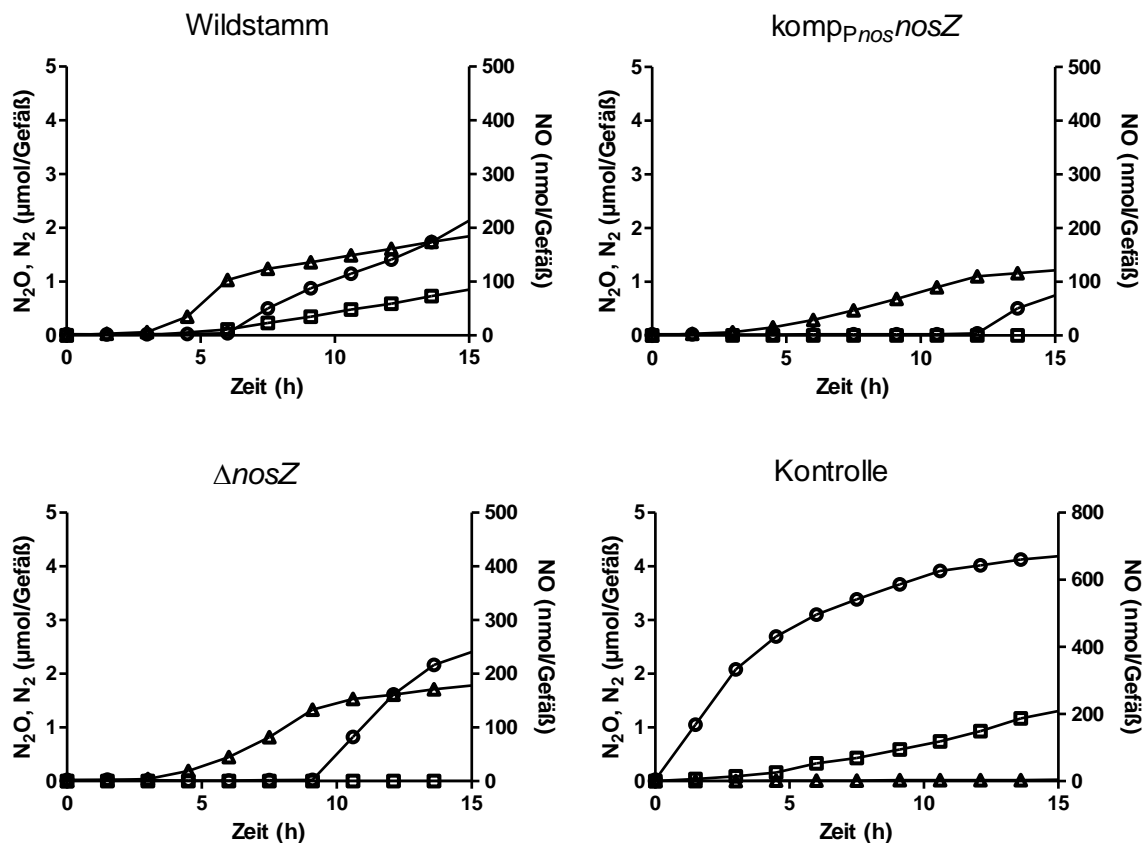


Abb. 18: Substanzspektrum von *W. succinogenes* Stämmen in 80 mM Formiat/50 mM Nitrat-Medium, welches mit 0,5 % Brain-Heart Infusion sowie mit 10% Acetylen supplementiert wurde. Exemplarisch ist eine von drei Messreihen dargestellt; (□): N<sub>2</sub>-Konzentration im Inkubationsgefäß (μmol je Gefäß), (○): NO-Konzentration im Inkubationsgefäß (nmol je Gefäß), (Δ): N<sub>2</sub>O-Konzentration im Inkubationsgefäß (μmol je Gefäß), Inkubationstemperatur 37 °C; Kontrolle: Medium ohne Zellen mit 30 mM Kaliumnitrit

---

#### 4.1.6. Charakterisierung von *W. succinogenes* $\Delta nrfHA$ , *W. succinogenes* $\Delta fdp$ und *W. succinogenes* $\Delta fdp \Delta nrfHA$

Sowohl die periplasmatische Cytochrom *c* Nitritreduktase (NrfA) als auch das cytoplasmatische Flavodieisenprotein (Fdp) sind bekannte und gut charakterisierte Proteine, welche in der Abwehr von nitrosativem Stress in *W. succinogenes* involviert sind (Kern *et al.*, 2011b). Da neben dem N<sub>2</sub>O- auch der NO-Verbrauch während des Wachstums durch Nitrat-Ammonifikation charakterisiert werden sollte, wurden diesbezüglich erste Versuche (Messung alle 4 h über einen Zeitraum von 48 h) in den drei Varianten des Nitrat-haltigen Mediums (Tabelle 8) mit den Stämmen *W. succinogenes*  $\Delta nrfHA$ , *W. succinogenes*  $\Delta fdp$  sowie mit der Doppelmutante *W. succinogenes*  $\Delta fdp \Delta nrfHA$  durchgeführt (Abb. 20). Alle drei Stämme enthalten ein Insertionselement (IS1302), welches das *nosZ*-Gen unterbricht. Die Deletion des Cytochrom *c* Nitritreduktase-Komplexes NrfHA führt zu einer Anhäufung von Nitrit, da dieses nicht weiter zu Ammonium umgesetzt werden kann (Eichler, 2001; Simon *et al.*, 2000). Die Unfähigkeit der Nitritverwertung resultiert des Weiteren in einer deutlich niedrigeren optischen Dichte von maximal 0,3 im Nitrat-haltigem Medium (Abb. 19). Die Verdopplungszeiten der Zellen der Einfach- sowie der Doppelmutante sind mit  $1,99 \pm 0,12$  h bzw.  $2,19 \pm 0,12$  h im Vergleich zu den Zellen von *W. succinogenes* Wildstamm mit  $1,6 \pm 0,13$  h erhöht. Die Deletion des Fdp kodierenden Gens führt hingegen im Vergleich zu *W. succinogenes* Wildstamm zu keinen nennenswerten Unterschieden im Wachstumsverhalten sowie im Substanzspektrum hinsichtlich des Nitrat- und Nitritumsatzes (Daten nicht gezeigt). Unterschiede im Wachstum der drei Stämme sind in Formiat/Fumarat-Medium (Kapitel 3.2.1.), in welchem Fumarat als alleiniger Elektronenakzeptor und Formiat als Elektronendonator verwendet wird, nicht zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

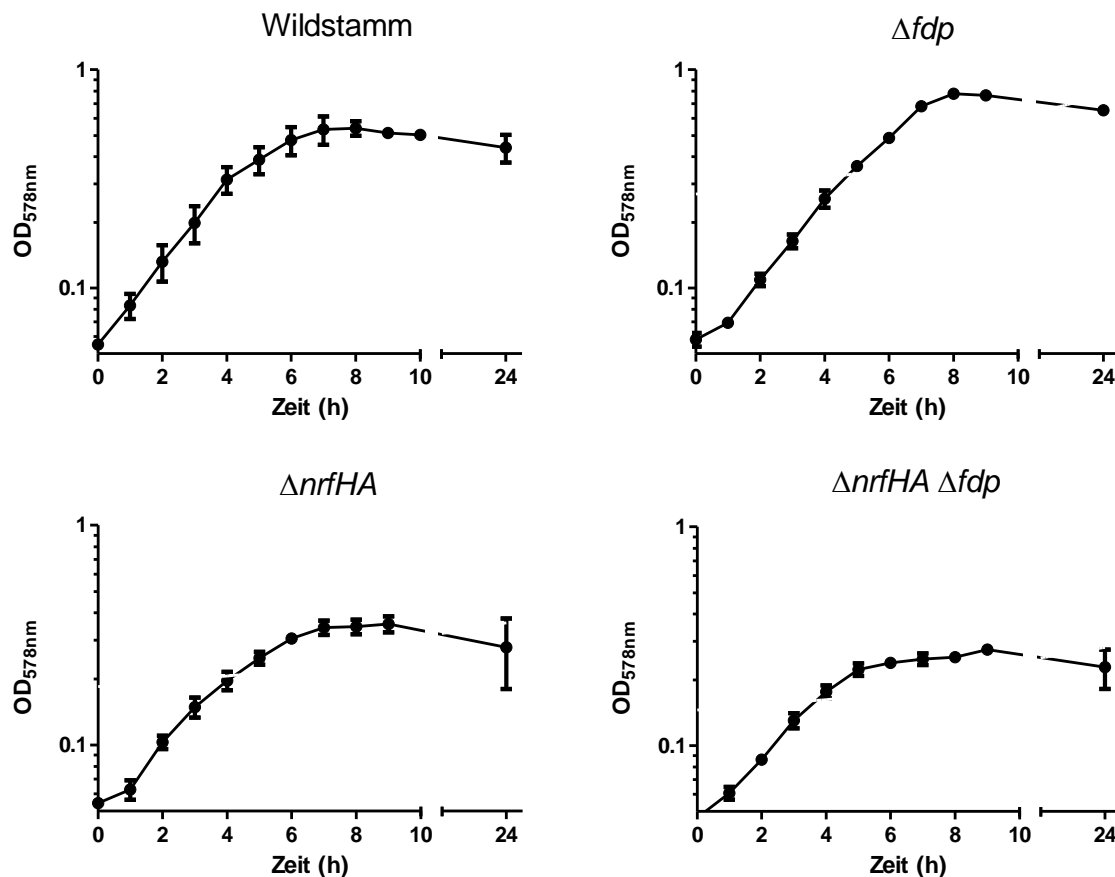


Abb. 19: Wachstumskurve von *W. succinogenes* Stämmen in 80 mM Formiat/50 mM Nitrat-Medium, welches mit 0,5 % Brain-Heart Infusion supplementiert wurde. Inkubationstemperatur 37 °C (Dreifachbestimmung mit Standardabweichung)

Um allen *W. succinogenes* Stämmen möglichst dieselben Ausgangsbedingungen zu ermöglichen, wurden die Vorkulturen für die Inokulation auf Formiat/Fumarat-Medium vermehrt. Für die Analyse der Gasproduktion und des Gasverbrauchs wurden die drei Stämme in den zuvor beschriebenen drei Varianten eines Nitrat-haltigen Mediums (Tabelle 8) kultiviert. Da sich vergleichbare Messdaten in den beiden Formiat-limitierten/Nitrat-reichen Medien (80 mM Formiat/50 mM Nitrat und 50 mM Formiat/50 mM Nitrat) ergaben, ist exemplarisch das Substanzspektrum des Mediums mit 80 mM Formiat/50 mM Nitrat graphisch dargestellt (Abb. 20 linke Spalte). In Kulturen mit *W. succinogenes* Wildstamm sind in der stationären Phase ungefähr 250 nmol NO pro Inkubationsgefäß zu detektieren. Zum gleichen Zeitpunkt sind in Kulturen mit *W. succinogenes*  $\Delta nrfHA$  und *W. succinogenes*  $\Delta fdp$  450 nmol bzw. 400 nmol Stickstoffmonoxid akkumuliert. Das sind 60 bzw. 80 % mehr NO im Vergleich zu *W. succinogenes* Wildstamm. Dies entspricht auch den Erwartungen. Da beide Proteine NrfA und Fdp nachweislich an der Detoxifikation von NO beteiligt sind (Kern *et al.*, 2011b; Saraiva *et al.*, 2004), wurden höhere NO-Konzentrationen in Kulturen mit den entsprechenden *W. succinogenes* Deletionsmutanten erwartet. In Kulturen mit *W. succinogenes*

---

$\Delta fdp \Delta nrfHA$  hingegen akkumuliert lediglich 23 nmol NO pro Inkubationsgefäß aber 3  $\mu\text{mol}$   $\text{N}_2\text{O}$ . Die  $\text{N}_2\text{O}$  Menge ist damit im Vergleich zu Kulturen mit *W. succinogenes* Wildstamm (1,8  $\mu\text{mol}$  pro Inkubationsgefäß; Abb. 20 linke Spalte) deutlich erhöht. Auch bei *W. succinogenes*  $\Delta nrfHA$  mit 2,4  $\mu\text{mol}$   $\text{N}_2\text{O}$  und *W. succinogenes*  $\Delta fdp$  mit 4  $\mu\text{mol}$   $\text{N}_2\text{O}$  pro Inkubationsgefäß akkumuliert mehr Distickstoffmonoxid als in Kulturen mit *W. succinogenes* Wildstamm. Dies entspricht nicht den Erwartungen. Es war anzunehmen, dass es zu einer geringeren Anreicherung an  $\text{N}_2\text{O}$  im Vergleich zu Kulturen mit *W. succinogenes* Wildstamm kommt. Dies legt die Möglichkeit eines weiteren NO detoxifizierenden Proteins nahe, deren entstehendes Produkt  $\text{N}_2\text{O}$  ist (Kapitel 5.1.). Eine enzymatische Produktion von  $\text{N}_2$  wie zuvor in der Kultur mit *W. succinogenes*  $\text{comp}_{\text{pnos}}\text{nosZ}$  ist in keiner der in Abb. 20 dargestellten Kulturen zu beobachten gewesen. Der lineare Anstieg der  $\text{N}_2$ -Menge ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die zuvor beschriebene chemische Reaktion des Nitrits mit Bestandteilen des Mediums zurückzuführen (vergleiche Abb. 9).

Erhöhte Konzentrationen an NO und  $\text{N}_2\text{O}$  lassen sich auch im Formiat-reichen/Nitrat-limitierten (80 mM Formiat/10 mM Nitrat) Medium in Kulturen der Deletionsmutanten *W. succinogenes*  $\Delta nrfHA$ , *W. succinogenes*  $\Delta fdp$  und *W. succinogenes*  $\Delta fdp \Delta nrfHA$  nachweisen (Abb. 20 rechte Spalte). Während in Kulturen mit *W. succinogenes* Wildstamm und *W. succinogenes*  $\Delta fdp$  kein NO nachweisbar war, akkumulierte in *W. succinogenes*  $\Delta nrfHA$  und *W. succinogenes*  $\Delta fdp \Delta nrfHA$  Kulturen bis zu 6 mmol NO pro Inkubationsgefäß. Im Vergleich zu *W. succinogenes* Wildstamm sind die akkumulierten Mengen an  $\text{N}_2\text{O}$  in den Einfachmutanten mit 0,4  $\mu\text{mol}$   $\text{N}_2\text{O}$  um das Vierfache, in der Doppelmutante mit 0,6  $\text{N}_2\text{O}$   $\mu\text{mol}$  pro Inkubationsgefäß um das sechsfache erhöht (Abb. 20 rechte Spalte). Die detektierten  $\text{N}_2$ -Mengen steigen im Messzeitraum konstant an und sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die zuvor beschriebene chemische Reaktion des Nitrits mit Bestandteilen des Mediums zurückzuführen (vergleiche Abb. 9).

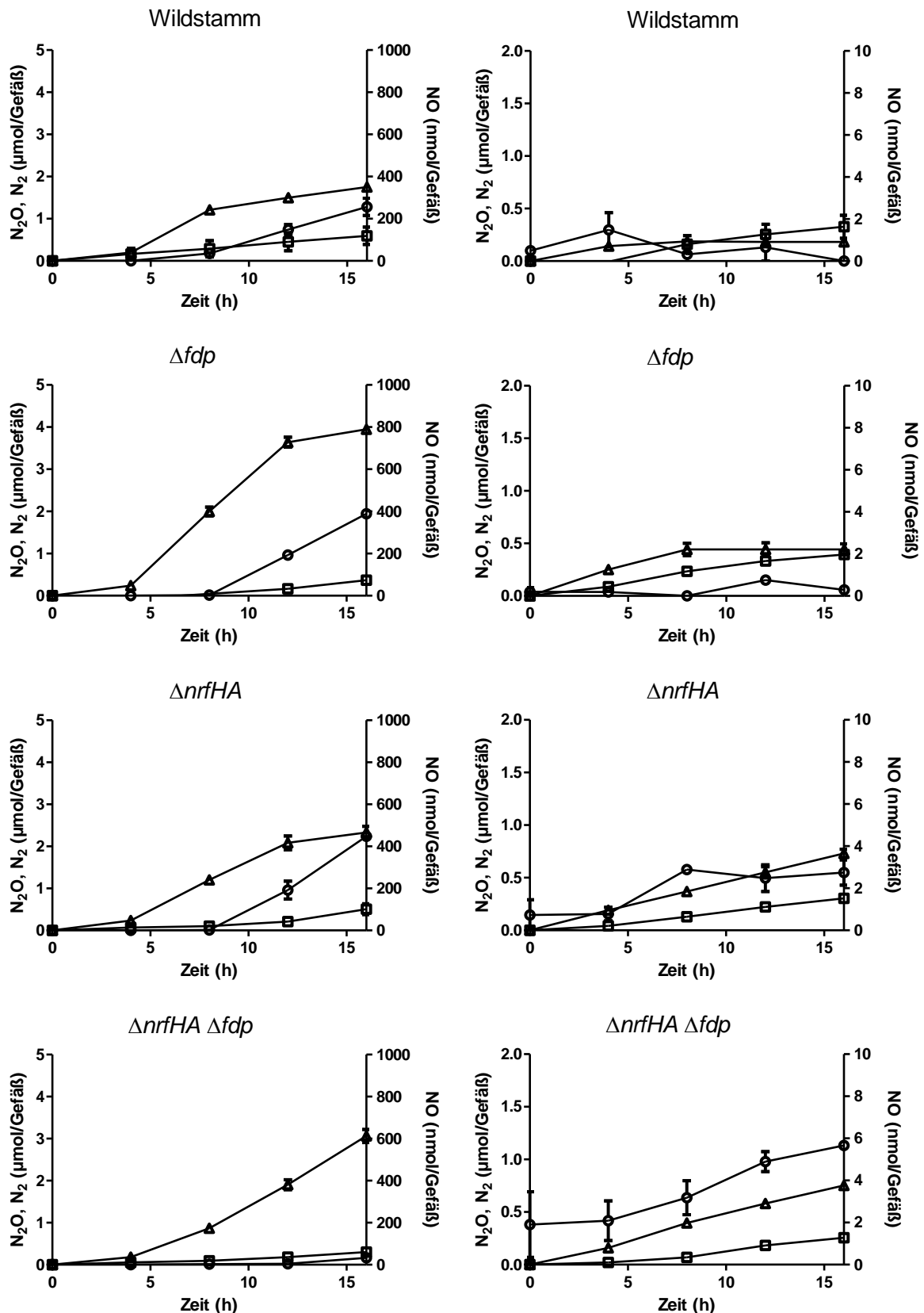


Abb. 20: Substanzspektrum von *W. succinogenes* Stämmen; Medium ist mit 0,5 % Brain-Heart Infusion supplementiert und die Ansätze wurden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert; Doppelbestimmung mit Standardabweichung; ( $\square$ ):  $N_2$ -Konzentration im Inkubationsgefäß ( $\mu\text{mol je Gefäß}$ ), ( $\circ$ ):  $NO$ -Konzentration im Inkubationsgefäß ( $\text{nmol je Gefäß}$ ), ( $\Delta$ ):  $N_2O$ -Konzentration im Inkubationsgefäß ( $\mu\text{mol je Gefäß}$ ); linke Reihe: 80 mM Formiat/50 mM Nitrat; rechte Reihe: 80 mM Formiat/10 mM Nitrat

---

## 4.2. Untersuchung des Wachstums durch N<sub>2</sub>O-Atmung

Für die Untersuchung des Wachstums mit N<sub>2</sub>O wurde ein Basismedium hergestellt (Kapitel 3.2.1.), welches Formiat als Elektronendonator enthält. Das enthaltende Fumarat (5 mM) diente zunächst als Elektronenakzeptor und ermöglicht das Anwachsen der Kulturen bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0,15. Das aus Fumarat entstandene Succinat stand den Zellen dann als C-Quelle zur Verfügung. Das Medium wurde anaerobisiert und die Gasphase mit N<sub>2</sub>O angereichert (Kapitel 3.2.1.). Als Kontrolle wurden Kulturen ohne N<sub>2</sub>O-Zugabe mitgeführt. Die Inokulierung erfolgte mit auf Nitrat vermehrten *W. succinogenes* Wildstamm, *W. succinogenes* komp<sub>P<sub>nos</sub></sub>*nosZ* und *W. succinogenes* Δ*nosZ* Zellen. Ein Wachstum über eine OD<sub>578nm</sub> von 0,15, welche durch die Fumarat-Atmung bedingt war, wurde in keiner der Kulturen gemessen. Im Zuge dessen wurde das Verhältnis der Volumina von Flüssig- zu Gasphase variiert und deckte einen Bereich von 1:2 bis 1:20 ab (25 - 50 ml Kulturvolumina). Des Weiteren wurden die Inkubationsgefäße schüttelnd bei 120 rpm inkubiert, um eine optimale Durchmischung beider Phasen und damit eine Sättigung des Mediums mit N<sub>2</sub>O zu gewährleisten. Der Nachweis von Wachstum wurde jedoch unter keiner der getesteten Bedingungen beobachtet. Kontrollexperimente mit Nitrat als Akzeptor und Wasserstoff als Donor sollten die grundsätzliche Fähigkeit von *W. succinogenes* Zellen zeigen, mit Gas in den verwendeten Inkubationsgefäßen zu wachsen. Hierfür wurde anoxisches Nitrat-haltiges Medium (Kapitel 3.2.1.) ohne Formiat verwendet. Die Gasphase bestand aus Wasserstoff. Die Überprüfung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm zeigte eine Zunahme der Zelldichte bis 0,6 innerhalb der ersten 7 h nach der Inokulierung (Daten nicht gezeigt). Dies entsprach auch den Erwartungen (Gross *et al.*, 2004)

Variationen des Basismediums mit N<sub>2</sub>O und zusätzlichem Nitrat (5 und 10 mM) als initialem Elektronenakzeptor führten ebenfalls zu keinem detektierbaren Wachstum mit N<sub>2</sub>O. Zwar wurde eine Zunahme der optischen Dichte innerhalb der ersten 3- 4 h gemessen, jedoch war dies ebenfalls in den Kontrollkulturen ohne N<sub>2</sub>O zu beobachten und folglich ein Resultat der Nitrat-Atmung (Daten nicht gezeigt). Eine weitere Zunahme der Zelldichte auf Grund der N<sub>2</sub>O-Atmung wurde nicht detektiert. Des Weiteren führte weder die Zugabe von Succinat (5 mM) anstelle von Fumarat zu einem Wachstum mit N<sub>2</sub>O noch die Inkubation der Kulturen bei verschiedenen Temperaturen (20 °C, 28 °C, 37 °C). Auch die Zugabe des Reduktionsmittels Thioglycolat (0,5%) zur Eliminierung von verbliebenem Sauerstoff, welcher die N<sub>2</sub>O-Reduktase inaktiviert (Zumft & Kroneck, 2007), zeigte keinen Effekt.

Als alternatives Medium wurde VSY mit 0,1 % Hefeextrakt verwendet (Kapitel 3.2.1.). Die Kultivierung erfolgte in 120 ml Gefäßen, mit 10 ml Medium und 16% v/v N<sub>2</sub>O (Yoshinari, 1980). Zur Überprüfung des grundsätzlichen Wachstums von *W. succinogenes* in diesem



---

Medium wurden im Kontrollansatz anstelle des N<sub>2</sub>O als Elektronenakzeptor 50 mM Nitrat eingesetzt. Eine Zunahme der optischen Dichte von 0,05 auf 0,29 nach 18 h bei 37 °C, wie sie durch Yoshinari (1980) beschrieben wurde, konnte lediglich bei den mit Nitrat versetzten Kulturen bestimmt werden.

Da die Expression von *nosZ* in *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Paracoccus denitrificans* durch Stickstoffmonoxid aktiviert wird (Arai *et al.*, 2002; Bergaust *et al.*, 2012; Vollack & Zumft, 2001), war der Einsatz von NO-Donatoren ein weiterer Ansatz zur Untersuchung des Wachstums mit N<sub>2</sub>O. Durch die zuvor beschriebenen gaschromatographischen Analysen wurde aufgezeigt, dass es durch eine chemische Dekomposition von Brain-Heart Infusion Zusatz und Nitrit zu einer Akkumulation von Stickstoffmonoxid kommt (Abb. 9, Abb. 12). Jedoch erfolgt diese erst ab Mitte bis Ende der exponentiellen Wachstumsphase (5 - 8h). Um eine mögliche NO-vermittelte Expression bereits zu Beginn des Wachstums zu induzieren, wurde Natrium-Nitroprussid (SNP) - eine NO-freisetzende Substanz - eingesetzt. Erste Versuche in Nitrat-haltigem Medium wurden durchgeführt, um eine geeignete Konzentration zu ermitteln, die keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten sowie auf die Vitalität der Zellen hat. *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>*nosZ* wurde mit 1 µM SNP in Basismedium angezogen, welches zuvor mit N<sub>2</sub> oder N<sub>2</sub>O anaerobisiert wurde. Ein Wachstum der Zellen war bei beiden Ansätzen in den ersten 3 Stunden nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Als der zugesetzte initiale Elektronenakzeptor Fumarat (5 mM) in den Kulturen jedoch aufgebraucht war, stagnierte das Wachstum bei einer optischen Dichte von 0,15. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass kein Wachstum von *W. succinogenes* Wildstamm und *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>*nosZ* durch N<sub>2</sub>O-Atmung beobachtet wurde. Dies entspricht nicht den Erwartungen, da dies bereits durch Yoshinari 1980 gemessen wurde. Eine denkbare Erklärung wäre die Präsenz des Insertionselementes im *cNosZ* kodierenden Gen in *W. succinogenes* Wildstamm (siehe Kapitel 5.3.). Ein weiterer Grund könnte eine mögliche Toxizität des verwendeten N<sub>2</sub>O für die Wachstumsexperimente sein.

#### 4.3. Ermittlung einer möglichen Toxizität von N<sub>2</sub>O auf *W. succinogenes*

Zellen von *W. succinogenes* Wildstamm, *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>*nosZ* und *W. succinogenes* Δ*nosZ* wurden auf anoxischem Nitrat-haltigem Medium (80 mM Formiat/50 mM Nitrat) vermehrt. Die Gasphase bestand aus Stickstoff und wurde mit definierten Mengen an N<sub>2</sub>O versetzt. Dies diente der Ermittlung einer möglichen Toxizität des verwendeten Gases N<sub>2</sub>O auf *W. succinogenes* Zellen. Als Kontrolle fungierte Medium ohne einen Zusatz von N<sub>2</sub>O zur Gasphase. Alle drei Stämme wiesen vergleichbare Verdopplungszeiten von 1,65 ± 0,10 h und finale optische Dichten bei einer Wellenlänge von 578nm von 0,6 – 0,7 auf [Abb. 21 (Die

Wachstumskurve in Gegenwart von 20% N<sub>2</sub>O in der Gasphase ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt)]. Ein Einfluss des inerten Gases auf das Wachstum konnte unter den getesteten Bedingungen weder bei 10%, 20% noch 100% N<sub>2</sub>O in der Gasphase nachgewiesen werden.

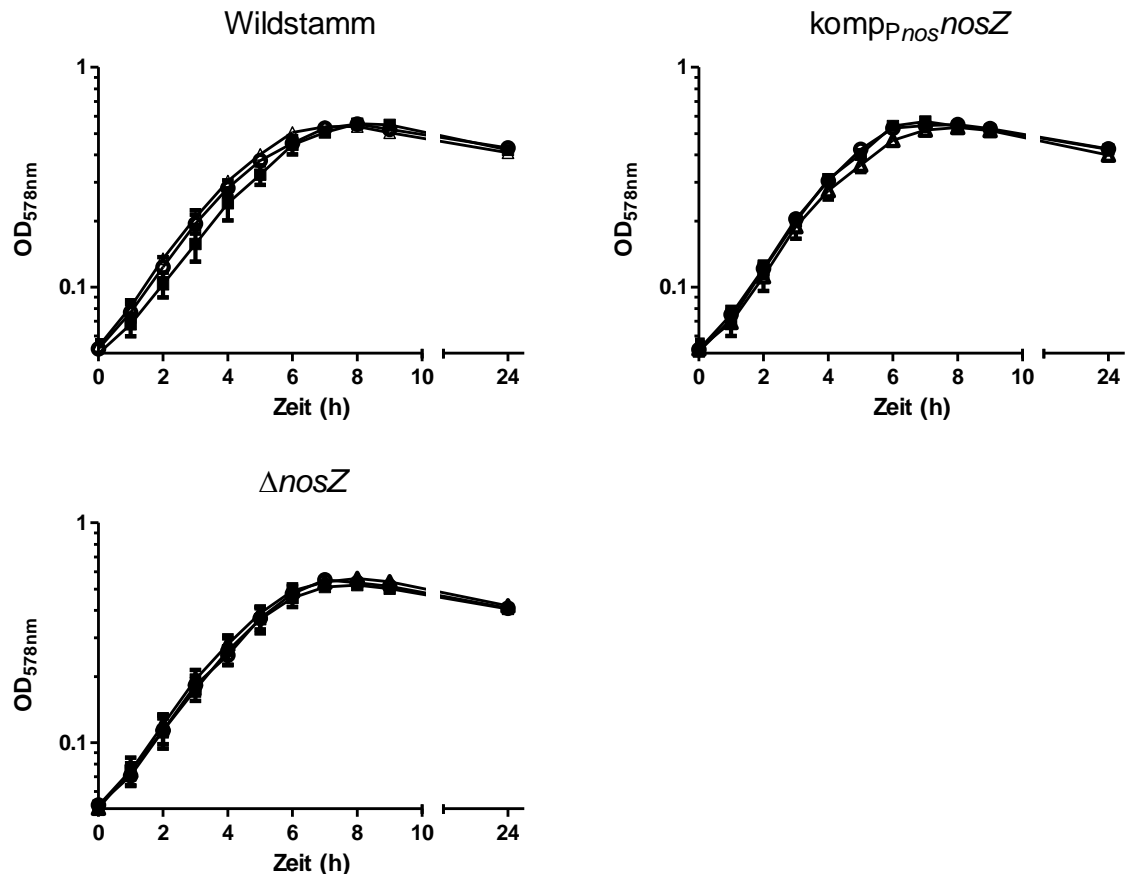


Abb. 21: 80 mM Formiat/ 50 mM Nitrat-Medium, welches mit 0,5% Brain-Heart Infusion supplementiert wurde und definierten Mengen N<sub>2</sub>O in der Gasphase. N<sub>2</sub> (■), 10% N<sub>2</sub>O (○), 100% N<sub>2</sub>O (Δ), Inkubationstemperatur 37 °C; Dreifachbestimmung mit Standardabweichung

#### 4.4. Die N<sub>2</sub>O-Reduktase cNosZ

##### 4.4.1. Konstruktion und Charakterisierung von *W. succinogenes* komp<sub>P<sub>nos</sub></sub>nosZ Tat

Die gut charakterisierten N<sub>2</sub>O-Reduktasen aus *Pseudomonas stutzeri* und *Paracoccus denitrificans* verfügen über Tat-Signalpeptide, besitzen aber C-terminal keine Cytochrom *c*-Domäne mit einem CXXCH Häm *c*-Bindemotiv. Ein Austausch des Sec-Signalpeptides der N<sub>2</sub>O-Reduktase von *W. succinogenes* gegen ein Tat-Signalpeptid sollte zeigen, ob trotzdem eine Produktion des Enzyms mit Häm-Gruppe erfolgen kann.

Als Matritze für die Konstruktion von *W. succinogenes* komp<sub>P<sub>nos</sub></sub>nosZ Tat wurde das Plasmid pkomp<sub>P<sub>nos</sub></sub>nosZ kan genutzt. Mit Hilfe der beiden Primer Pnos-R und nosZ-10 wurde ein lineares Fragment mit dem nosZ Gen ohne Sec-Signalpeptid vom Plasmid erstellt. Die

Tat-Signalsequenz der Nickel/Eisen-Hydrogenase aus dem Genom von *W. succinogenes* wurde durch das Primerpaar HydA Tat f und HydA Tat r amplifiziert. Beide Fragmente wurden über glatte Enden ligiert und der Einbau der Signalsequenz in derselben Richtung wie die *nosZ* Sequenz mittels HydA Tat K in einer PCR bestätigt. Die Sequenzierung mit dem Primer pPR-IBASeq-F bestätigte die gewünschte Veränderung. Das Plasmid *pkomp<sub>Pnos</sub>nosZ* Tat *kan* (Abb. 22) wurde durch Transformation von *W. succinogenes*  $\Delta$ *nosZ* eingebracht. Die resultierenden Transformanten wurden mit dem Antibiotikum Kanamycin selektiert und hinsichtlich der doppelt homologen Rekombination (Abb. 6) mit Hilfe von Screen NosZ-F und Screen NosZ-R in einer PCR bestätigt. Bei einer doppelt homologen Rekombination wird ein Fragment mit der Größe von 5185 bp amplifiziert. Die beiden positiven Klone wurden als *W. succinogenes* *kom<sub>Pnos</sub>nosZ* Tat bezeichnet.

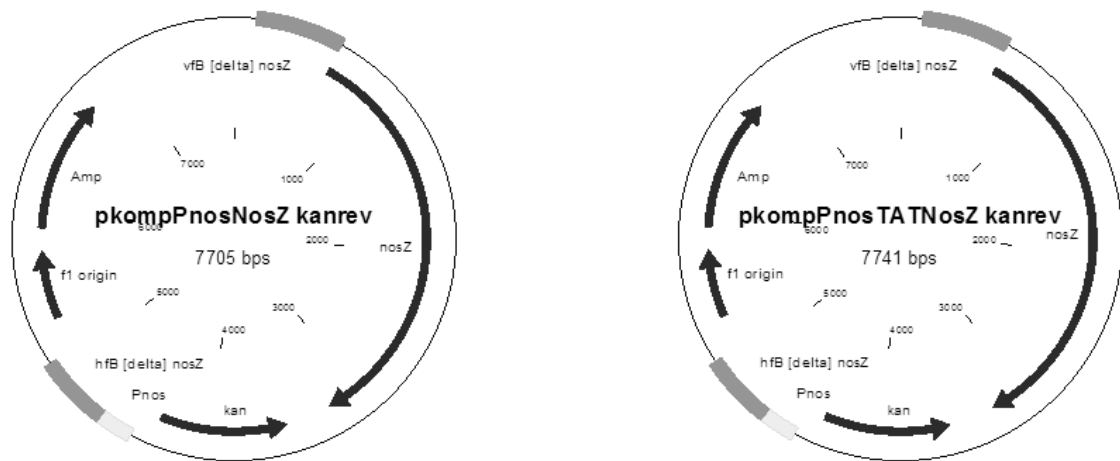


Abb. 22: Vektorkarte von *pkomp<sub>Pnos</sub>nosZ* *kan* und *pkomp<sub>Pnos</sub>nosZ* Tat *kan*

In erster Linie sollte mittels Hämfärbung untersucht werden, ob trotz des veränderten Signalpeptides ein Einbau der Häm-Gruppe erfolgt. Es wurden zwei positive Transformanten in Nitrat-haltigem Medium angezogen. Inokuliert wurde mit Fumarat gewachsenen Zellen und einer optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm von 0,05. In den ersten 4 h ist das Wachstum der beiden Kulturen *W. succinogenes* *kom<sub>Pnos</sub>nosZ* und *W. succinogenes* *kom<sub>Pnos</sub>nosZ* Tat vergleichbar (Abb. 23). Jedoch zeigte sich nach 4 h ein deutlich verlangsamtes Wachstum in den Kulturen mit *W. succinogenes* *kom<sub>Pnos</sub>nosZ* Tat im Vergleich zu *W. succinogenes* *kom<sub>Pnos</sub>nosZ*. Dies spiegelt sich in der höheren Verdopplungszeit von  $2,28 \pm 0,13$  h und einer geringeren finalen optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm von maximal 0,4 wider. Kulturen mit *W. succinogenes* *kom<sub>Pnos</sub>nosZ* erreichen eine finale optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578nm von 0,7 bei einer Verdopplungszeit von  $1,53 \pm 0,26$  h.

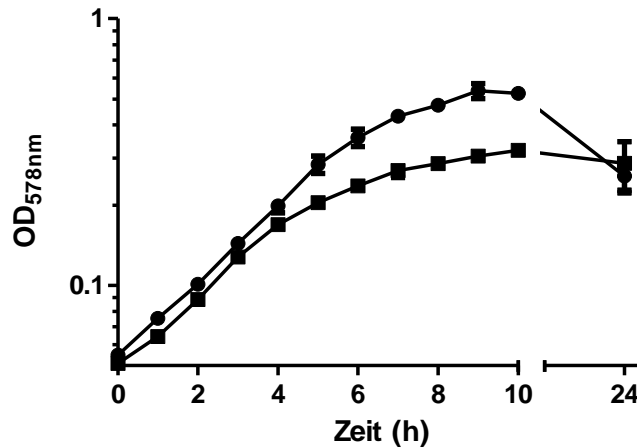


Abb. 23: Wachstumskurve von *W. succinogenes* komp<sub>pnos</sub>nosZ (●) und komp<sub>pnos</sub>nosZ Tat (■) in 80 mM Formiat/50 mM Nitrat-Medium, welches mit 0,5 % Brain-Heart Infusion supplementiert ist. Inkubationstemperatur 37 °C; Dreifachbestimmung mit Standardabweichung

Wie Abb. 24 (A) zeigt, war lediglich ein Signal bei 58 kDa (NrfA) jedoch nicht bei 95 kDa (cNosZ) in der Hämfärbung von den beiden Transformanden detektierbar. Als Positivkontrolle diente *W. succinogenes* komp<sub>pnos</sub>nosZ. Da der Einbau von Häm-Gruppen im Periplasma erfolgt (Simon & Hederstedt, 2011), wäre es möglich, dass durch den Austausch des Signalpeptides kein oder ein unzureichender Transport des Apocytochroms vom Cytoplasma erfolgt. Durch Western Blot-Analyse mit einem Antiserum gegen *W. succinogenes* N<sub>2</sub>OR (Kapitel 3.6.6. und 3.7.) wurde überprüft, ob das Apocytochrom vorhanden ist. Das NosZ-Protein ließ sich in keiner der beiden Transformanden nachweisen (Abb. 24 B, Spur 1 und 2). Die Positivkontrolle (Spur 3), *W. succinogenes* komp<sub>pnos</sub>nosZ, welche nachweislich cNosZ produziert, reagierte mit dem Antikörper gegen NosZ. Das zweite sichtbare Signal könnte ein Abbauprodukt der N<sub>2</sub>O-Reduktase sein. Der Austausch des Sec-Signalpeptides der N<sub>2</sub>O-Reduktase von *W. succinogenes* gegen ein Tat-Signalpeptid führt zu keiner Produktion des Enzyms mit Häm-Gruppe. Die höhere Verdopplungszeit in der exponentiellen Phase bei *W. succinogenes* komp<sub>pnos</sub>nosZ Tat könnte durch eine Behinderung des Tat-Transportsystems der gesamten Zelle zustande kommen.

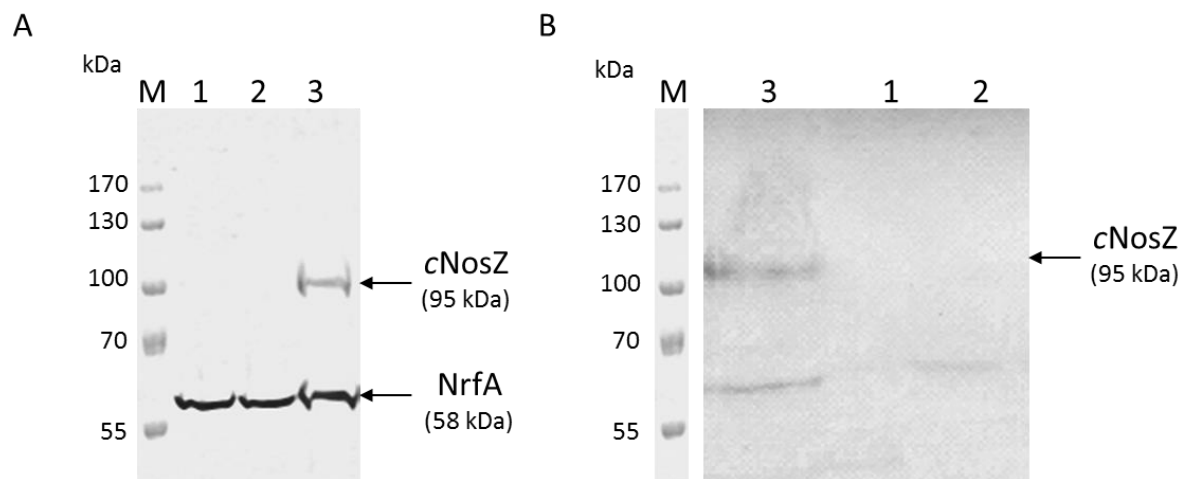


Abb. 24: 10% iges Polyacrylamid-Gel von ganzen Zellen; 150 µg Probe in jeder Spur; Spur 1: *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>nosZ Tat Klon 5; Spur 2: *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>nosZ Tat Klon 13; Spur 3: *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>nosZ<sub>Δ</sub>; Spur M: PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas); NrfA: Cytochrom c Nitritreduktase (Kern *et al.*, 2010) A. Häm-färbung; B. ELISA gegen cNosZ

#### 4.4.2. Bestimmung der Elektronentransportaktivität Formiat → N<sub>2</sub>O

Mit einem Assay sollte die Elektronentransportaktivität der N<sub>2</sub>O-Reduktase in einer Zellsuspension bestimmt werden. Dafür wurde Formiat als Elektronendonator und N<sub>2</sub>O als Elektronenakzeptor verwendet. Der N<sub>2</sub>O-Verbrauch durch die Zellen sollte indirekt durch die Abnahme der Formiat-Konzentration detektiert werden. Für die Reduktion von einem Molekül N<sub>2</sub>O zu N<sub>2</sub> werden zwei Elektronen benötigt, welche durch die Oxidation von einem Molekül Formiat geliefert werden. Für diesen Versuchsansatz wurden auf Formiat/Nitrat oder Formiat/Fumarat-Medium vermehrte Zellen von *W. succinogenes* Wildstamm und *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>nosZ verwendet, welche sich in der spätexponentiellen Phase befanden. *W. succinogenes* Wildstamm diente in diesem Assay als Negativkontrolle, da Zellen dieses Stammes über keine N<sub>2</sub>O-Reduktaseaktivität verfügen (Abb. 12). Die Zellen der angezogenen Kulturen wurden abzentrifugiert und mögliche Rückstände des Mediums durch zweimaliges Waschen entfernt. Die Zellen wurden in BICIN-Puffer (5 ml) resuspendiert und im Zuge der Anaerobisierung mit N<sub>2</sub>O angereichert (Kapitel 3.4.3.). Nach dem Start des Testes durch die Zugabe von Formiat wurden Proben genommen (0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min) und die Formiat-Konzentration bestimmt (Kapitel 3.6.3.).

Bei einer Kultur von 10 ml wurde keine Abnahme der Formiat-Konzentration, bedingt durch die Reduktion des Distickstoffmonoxides durch die Zellsuspension, gemessen. Auf Grund dessen wurden verschiedene Kulturvolumina eingesetzt (50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml) sowie mehrere Temperaturbereiche abgedeckt (25 °C, 30 °C, 37 °C). Ab einem Kulturvolumen von 100 ml wurde die Zellsuspension schüttelnd bei 120 rpm inkubiert, um eine

---

gleichmäßigere Verteilung von  $\text{N}_2\text{O}$  im Puffer zu gewährleisten. Unter keiner der getesteten Bedingungen konnte eine Abnahme der Formiat-Konzentration nachgewiesen werden. Um eine mögliche Inaktivierung der  $\text{N}_2\text{O}$ -Reduktase durch Sauerstoff auszuschließen, wurde eine 20 ml Kultur wie in Kapitel 3.4.3. beschrieben unter strikt anaeroben Bedingungen im Anaerobenzelt, das nachweislich keinen Sauerstoff enthält (Überprüfung mittels  $\text{O}_2$ -Elektrode) behandelt. Ein Verbrauch an Formiat konnte jedoch nicht detektiert werden. Dass eine Bestimmung der Aktivität des Elektronentransportes mit diesem Assay grundsätzlich mit intakten *W. succinogenes* Zellen möglich ist, bewiesen Kontrollexperimente mit Nitrit (Daten nicht gezeigt).

#### 4.4.3. Bestimmung der cNosZ Aktivität mittels artifizieller Elektronendonoren

Die Analysen mittels Gaschromatographie zeigten, dass *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>nosZ nur 10  $\mu\text{mol}$   $\text{N}_2\text{O}$  pro Inkubationsgefäß in einem Zeitraum von 10 h umsetzt (vergleiche Abb. 16). Da ein Nachweis der  $\text{N}_2\text{O}$ -Reduktaseaktivität gekoppelt an die Abnahme der Formiat-Konzentration nicht möglich war (Kapitel 4.5.2.), sollte diese mittels artifizieller Elektronendonoren bestimmt werden.

Die Zellen von *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>nosZ und *W. succinogenes*  $\Delta\text{nosZ}$  wurden zum Nachweis und zur Bestimmung der Aktivität von cNosZ auf Nitrat-haltigem Medium vermehrt. Der Assay wurde zunächst an intakten Zellen durchgeführt, wozu diese geerntet, in Tris-Puffer aufgenommen und anschließend mittels alternierendes Evakuieren und Begasen mit Stickstoff anaerobisiert wurden (Kapitel 3.4.1.). Reduziertes Benzylviologen ( $\text{BV}_{\text{red}}$ ) oder reduziertes Methylviologen ( $\text{MV}_{\text{red}}$ ) dienen als Elektronendonoren für die Reduktion von  $\text{N}_2\text{O}$ , welches gasförmig oder in Form von  $\text{N}_2\text{O}$  gesättigtem Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,0) in die Reaktion eingebracht wurde. Eine Abnahme der Extinktion bedingt durch die Oxidation von  $\text{BV}_{\text{red}}$  oder  $\text{MV}_{\text{red}}$  konnte nicht detektiert werden. Zusätzliche Variationen der eingesetzten Konzentrationen an  $\text{N}_2\text{O}$  und Gesamtprotein zeigten keine Auswirkungen. Um das Testspektrum zu erweitern, wurden verschiedene Temperatur- (25 °C, 30 °C, 37 °C), Puffer- (50 mM Kaliumphosphat- und 50 mM Tris/HCL-Puffer) sowie pH-Bereiche (6,5; 7,0; 7,5; 8,0) abgedeckt. Ein Nachweis der Aktivität war jedoch unter keiner der getesteten Bedingungen möglich. Nach Ablauf von 15 min wurde in einigen Küvetten Nitrit hinzugegeben (10  $\mu\text{l}$ , Endkonzentration: 10 mM). Die Entfärbung des Reaktionsansatzes erfolgte sofort (Daten nicht gezeigt). Diese Kontrollen zeigten, dass eine Bestimmung der Enzymaktivität mit diesem Test grundsätzlich mit intakten *W. succinogenes* Zellen möglich ist. Um mögliche Beeinträchtigungen des Assays durch intakte Zellen dennoch auszuschließen, wurden Zellen einer 800 ml Kultur geerntet und in Puffer resuspendiert. Der Aufschluss der

Zellen und die Fraktionierung erfolgten wie beschrieben (Kapitel 3.3.4. und 3.3.5.) mittels eines Hochdruck-Zellaufschlussystems und Ultrazentrifugation. Der Assay wurde sowohl mit der löslichen Fraktion als auch mit der unlöslichen Fraktion (jeweils 250  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein) durch Zugabe von gasförmigem  $\text{N}_2\text{O}$  gestartet. Es wurde ebenfalls keine Abnahme der Extinktion über einen Zeitraum von 30 min detektiert (Daten nicht gezeigt).

Es wird angenommen, dass Monohäm Cytochrome *c* als physiologische Elektronendonoren der  $\text{N}_2\text{O}$ -Reduktase fungieren (Simon *et al.*, 2004; Zhang & Hollocher, 1993). *In vitro* wurde versucht dieses System mittels gereinigtem Pferdeherzcytochrom *c*, welches ebenfalls ein Monohäm Cytochrom *c* ist, zu simulieren (Kapitel 3.4.2.). Reduziertes Pferdeherzcytochrom *c* weist wie alle Cytochrome *c* ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 550 nm auf. Der Nachweis von  $\text{N}_2\text{OR}$ -Aktivität sollte indirekt über die Abnahme der Extinktion bedingt durch die Oxidation des reduzierten Pferdeherzcytochroms *c* erfolgen. Da keine strikt anaerobe Aufreinigung von *cNosZ* möglich war, sollte zunächst die Aufnahme eines Absorptionsspektrums zeigen, ob es funktionell möglich ist, reduzierte Cytochrome *c* in Gegenwart von weiteren löslichen *W. succinogenes* Proteinen zu detektieren (Abb. 25). Dazu wurden zunächst 5  $\mu\text{M}$  Pferdeherzcytochrom *c* mit Hilfe von 0,25 mM Dithionit reduziert. Der Reaktionsansatz wurde dann mit definierten Mengen löslicher Fraktion versetzt und erneut gemessen. Ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 550 nm war immer detektierbar und damit eine Beeinflussung der Extinktion durch cytoplasmatische Proteine ausgeschlossen.

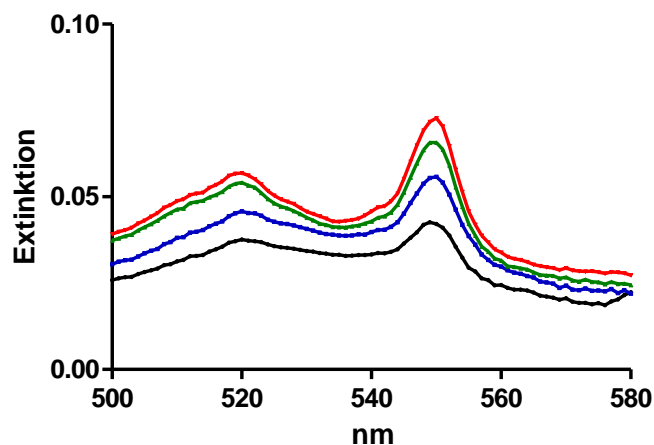


Abb. 25: Absorptionsspektren von reduziertem Pferdeherzcytochrom und Cytochromen *c* der löslichen Zellfraktion von *W. succinogenes*, mit Dithionit reduziertes Pferdeherzcytochrom (5  $\mu\text{M}$ ; schwarz) diente als Kontrolle. Zugabe definierter Mengen der löslichen Fraktion (55  $\mu\text{g}$  in blau; 110  $\mu\text{g}$  in grün; 165  $\mu\text{g}$  in rot).

---

Da in Kulturen mit *W. succinogenes* Wildstamm in der gaschromatographischen Analyse keine N<sub>2</sub>O-Reduktaseaktivität unter physiologischen Bedingungen nachgewiesen werden konnte, wurden in diesem Assay nur Zellen von *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>*nosZ* und *W. succinogenes*  $\Delta$ *nosZ* hinsichtlich einer Aktivität getestet. Dafür wurden Zellen in 800 ml Nitrat-haltigem Medium kultiviert und anschließend in lösliche und unlösliche Fraktionen separiert. Der Assay wurde sowohl mit der löslichen Fraktion als auch mit der unlöslichen Fraktion (jeweils 240  $\mu$ g Gesamtprotein, 5  $\mu$ M reduziertes Pferdeherzcytochrom c) durch Zugabe von gasförmigem N<sub>2</sub>O gestartet. In Intervallen von 15 min wurden über einen Zeitraum von 90 min Absorptionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 500 bis 580 nm aufgenommen. Eine Oxidation des Pferdeherzcytochroms c durch Proteine der löslichen oder unlöslichen Fraktion wurde nicht detektiert (Daten nicht gezeigt).

#### 4.5. Die Monohäm Cytochrome c NosC1 und NosC2

Die beiden Gene *nosC1* und *nosC2* sind benachbart im *nos*-Gencluster von *W. succinogenes* lokalisiert und kodieren jeweils ein Monohäm Cytochrom c. Flankiert werden die Gene von zwei weiteren offenen Leserahmen, die für die Proteine NosG und NosH kodieren (Baar *et al.*, 2003; Simon *et al.*, 2004). Es wird eine Beteiligung der vier Proteine beim Elektronentransportweg von Menachinol auf das Cytochrom c vom cNosZ vermutet (Sievert *et al.*, 2008; Simon *et al.*, 2004; Spiro, 2012). Die beiden Gensequenzen weisen N-terminal einen hydrophoben Bereich auf, der sowohl ein Sec-Signalpeptid als auch bei *nosC2* eine mögliche transmembrane Helix darstellen könnte. Da ein Nachweis der cNosZ Aktivität mit Hilfe artifizieller Elektronendonoren nicht möglich war, sollten die gereinigten Proteine NosC1 und NosC2 im zuvor beschriebenen Assay Anwendung finden. Hierfür wurde zunächst versucht die Produktion der beiden Cytochrome in *W. succinogenes* abzuschätzen. Zellen von *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>*nosZ* (Abb. 26; Spur 1), *W. succinogenes*  $\Delta$ *nosZ* (Spur 2) und *W. succinogenes*  $\Delta$ *nosG-H* (Spur 3) wurden in Nitrat-haltigem Medium (80 mM Formiat/50 mM Nitrat) vermehrt und in der spätexponentiellen Phase Proben für eine Hämfärbung entnommen. Eine veränderte Färbung der Zellpellets nach der Zellernte war bei keiner der Kulturen zu beobachten. Die berechnete Größe von NosC1 mit 21,4 kDa und von NosC2 mit 17,1 kDa entspricht dem nicht prozessierten Apoprotein zu dem die Molekülmasse einer Häm-Gruppe mit 616 Da addiert wurde. Bei keinem der drei Stämme konnten zwei entsprechende Signale mittels der Färbung detektiert werden. Lediglich im Größenbereich von 19 kDa lassen sich Cytochrome c, wie NrfH oder NapB, nachweisen (Kern *et al.*, 2010). Ein Vergleich der Intensität der Bande bei 19 kDa in den Spuren lässt auf keine signifikant verringerte Menge an Cytochrom c bei *W. succinogenes*  $\Delta$ *nosG-H* schließen.



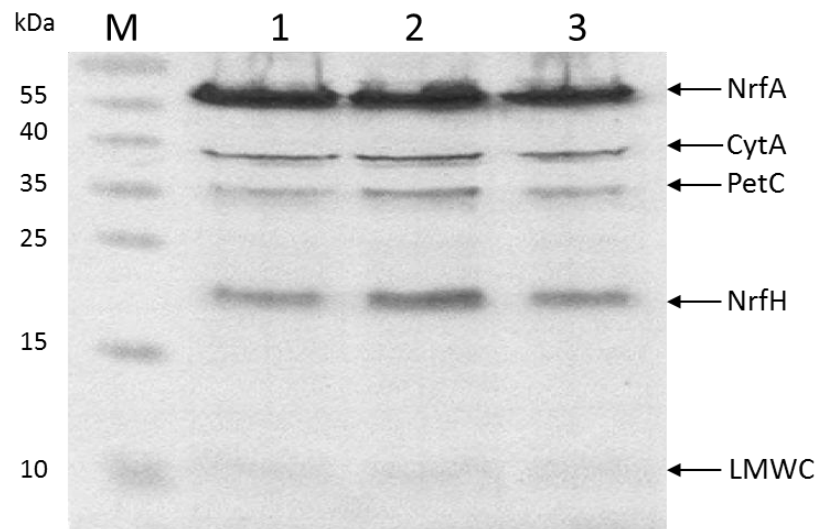


Abb. 26: Hämgefärbtes 15% iges Polyacrylamid-Gel von *W. succinogenes*; 100 µg Probe in jeder Spur; Spur 1: *W. succinogenes* komp<sub>P<sub>nos</sub></sub> *nosZ*; Spur 2: *W. succinogenes*  $\Delta$  *nosZ*; Spur 3: *W. succinogenes*  $\Delta$  *nosG-H*; Spur M: PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas); CytA: Membran-gebundenes Cytochrom unbekannter Funktion; PetC: Dihäm-Untereinheit des Cytochrom *bc<sub>1</sub>*-Komplexes; LMWC: niedermolekulare Cytochrome *c* mit einem Molekulargewicht von 14 kDa oder weniger (Kern *et al.*, 2010)

Für die Aufreinigung der Proteine NosC1 und NosC2 wurden im Verlauf der Arbeit verschiedene Vorgehensweisen getestet, welche in Tabelle 9 zusammengefasst sind und in den folgenden Kapiteln 4.5.1. bis 4.5.3. näher erläutert werden. Beide Cytochrom *c* Proteine wurden C-terminal mit einem *Strep*-Tag markiert. Zunächst wurde versucht NosC1 und NosC2 homolog in *W. succinogenes* zu produzieren.

Tabelle 9: Übersicht der getesteten Vorgehensweisen in dieser Arbeit zur Produktion von NosC1 und NosC2. Die Monohäm Cytochrom c-kodierenden Gene wurden mittels PCR aus dem jeweiligen Ursprungsorganismus amplifiziert.

Ursprungsorganismus	Produktionswirt	Promotor	Induktor	Locus	Plasmid
<i>W. succinogenes</i>	<i>W. succinogenes</i>	<i>nos</i>	Nitrat	Genomisch	$P_{nos}nosC1$ -Strep kan $P_{nos}nosC2$ -Strep kan
<i>W. succinogenes</i>	<i>W. succinogenes</i>	<i>nrf</i>		Genomisch	$pMK1-nosC1$ $pMK1-nosC2$
<i>W. succinogenes</i>	<i>E. coli</i>	T7	IPTG	Plasmid	$pIBA1-OmpA nosC1$ $pIBA1-OmpA nosC2$
<i>W. succinogenes</i>	<i>E. coli</i>	Tet	AHT	Plasmid	$pIBA2-nosC1$ $pIBA2-nosC2$
<i>S. denitrificans</i>	<i>E. coli</i>	Tet	AHT	Plasmid	$pASK-IBA2$ <i>Suden_1302</i>
<i>D. acetiphilus</i>	<i>E. coli</i>	Tet	AHT	Plasmid	$pASK-IBA2$ <i>Dacet_0945</i>

#### 4.5.1. Homologe Produktion von NosC1 und NosC2 im *nos*-Locus

Die Expression der affinitätsmarkierten Monohäm Cytochrome c NosC1 und NosC2 sollte in ihrem eigenen Gencluster unter dem natürlichen *nos*-Promotor erfolgen. Dazu wurden die Stämme *W. succinogenes*  $P_{nos} nosC1$ -Strep und *W. succinogenes*  $P_{nos} nosC2$ -Strep konstruiert. Die Klonierungsstrategie und die Vektorkarte sind exemplarisch von *W. succinogenes*  $P_{nos} nosC1$ -Strep in Abb. 27 dargestellt.

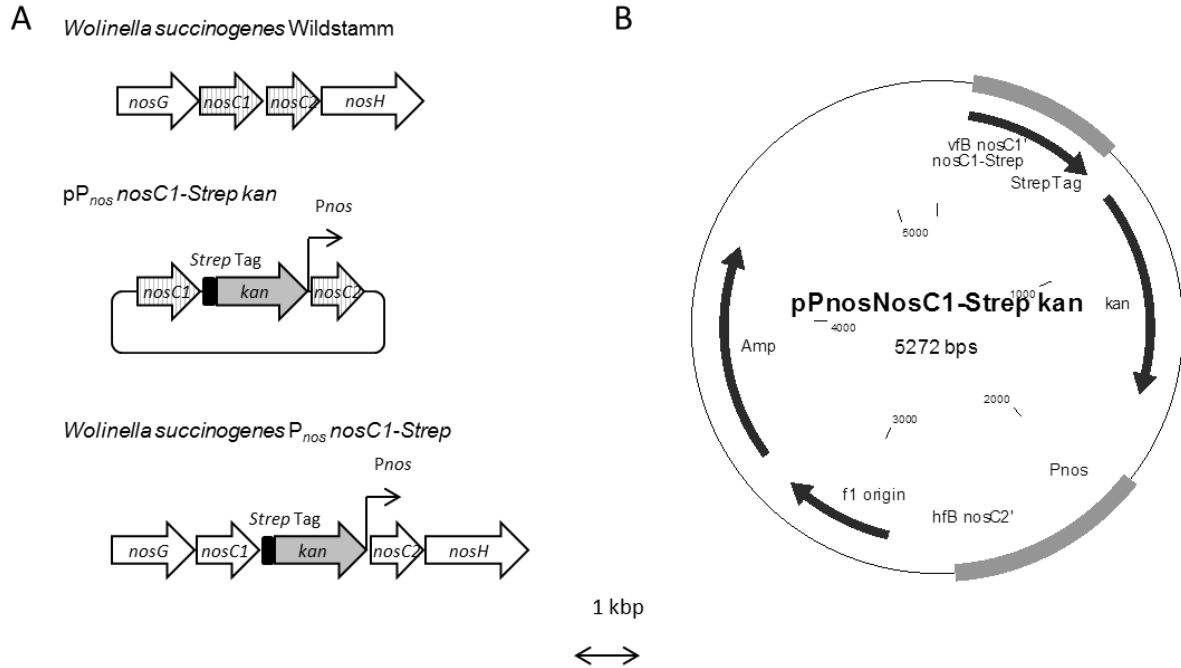
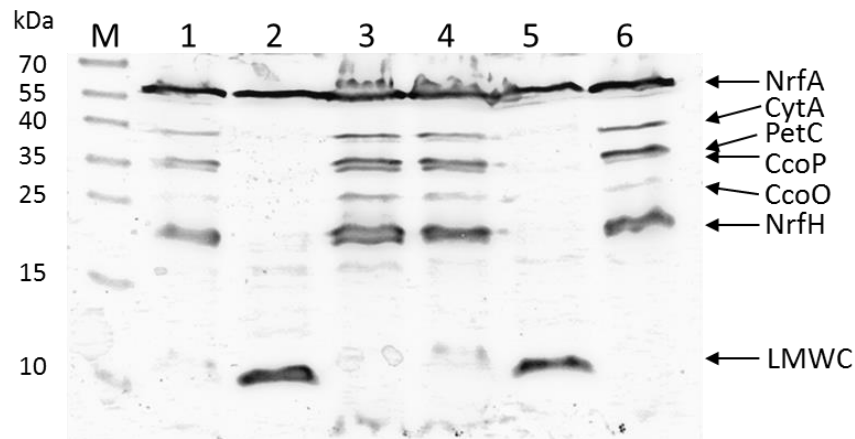


Abb. 27: A) Klonierungsstrategie zur Erstellung des Stammes *W. succinogenes*  $P_{nos}$  *nosC1-Strep* durch Transformation von *W. succinogenes* Wildstamm mit  $pP_{nos}$  *nosC1-Strep kan*; Bereiche für homologe Rekombination zwischen Genom und Plasmid sind schraffiert dargestellt; B) Vektorkarte von  $pP_{nos}$  *nosC1-Strep kan*

Die Zellen wurden in Nitrat-haltigem Medium vermehrt und anschließend in lösliche und unlösliche Fraktionen separiert (Kapitel 3.3.5.). In keiner der Fraktionen konnte mittels Häm- oder Immunfärbung ein entsprechendes Signal in der erwarteten Größe von NosC1 (21,4 kDa) und NosC2 (17,1 kDa) detektiert werden (Abb. 28). Die beiden Signale bei etwa 65 und 19 kDa in Abb. 28 B sind unspezifische Kreuzreaktionen des verwendeten Antikörper Konjugates gegen *Strep*-Tag II mit Biotin-assoziierten Proteinen. Das Gen *WS0565* kodiert für eine Biotin-abhängige Pyruvat Carboxylase und hat eine berechnete Größe von 65,8 kDa. *WS1072* hingegen kodiert für ein Biotin Carrier Protein mit einer berechneten Größe von 16,5 kDa.

A



B

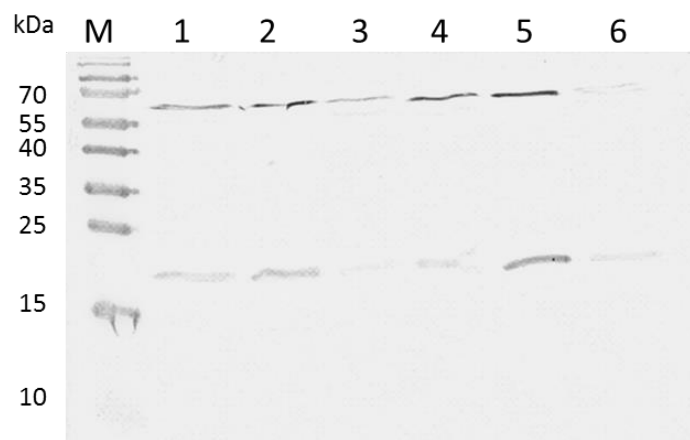


Abb. 28: 15% iges Polyacrylamid-Gel von *W. succinogenes*  $P_{nos}$  *nosC1-Strep* und *W. succinogenes*  $P_{nos}$  *nosC2-Strep*; 150  $\mu$ g Probe in jeder Spur; Spur 1: *W. succinogenes*  $P_{nos}$  *nosC1-Strep* Zellhomogenat; Spur 2: *W. succinogenes*  $P_{nos}$  *nosC1-Strep* lösliche Fraktion; Spur 3: *W. succinogenes*  $P_{nos}$  *nosC1-Strep* Membranfraktion; Spur 4: *W. succinogenes*  $P_{nos}$  *nosC2-Strep* Zellhomogenat; Spur 5: *W. succinogenes*  $P_{nos}$  *nosC2-Strep* lösliche Fraktion; Spur 6: *W. succinogenes*  $P_{nos}$  *nosC2-Strep* Membranfraktion; Spur M: PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas); A) Hämefärbung B) Western-Blot und ELISA gegen *NosC1-Strep* und *NosC2-Strep* mit einem Antikörper Konjugat gegen *Strep*-Tag II; CytA: Membran-gebundenes Cytochrom unbekannter Funktion; PetC: Dihäm-Untereinheit des Cytochrom *bc<sub>1</sub>*-Komplexes; CcoP: Untereinheit III der Cytochrom *cbb<sub>3</sub>* Oxidase; CcoO: Untereinheit II der Cytochrom *cbb<sub>3</sub>* Oxidase; LMWC: niedermolekulare Cytochrome *c* mit einem Molekulargewicht von 14 kDa oder weniger (Kern *et al.*, 2010)

#### 4.5.2. Homologe Produktion von NosC1 und NosC2 im *nrf*-Locus

Ein weiterer Ansatz der homologen Produktion von affinitätsmarkierten NosC1 und NosC2 war die Expression der Gene unter dem *nrf*-Promotor im *nrf*-Gencluster (Kern *et al.*, 2011a).

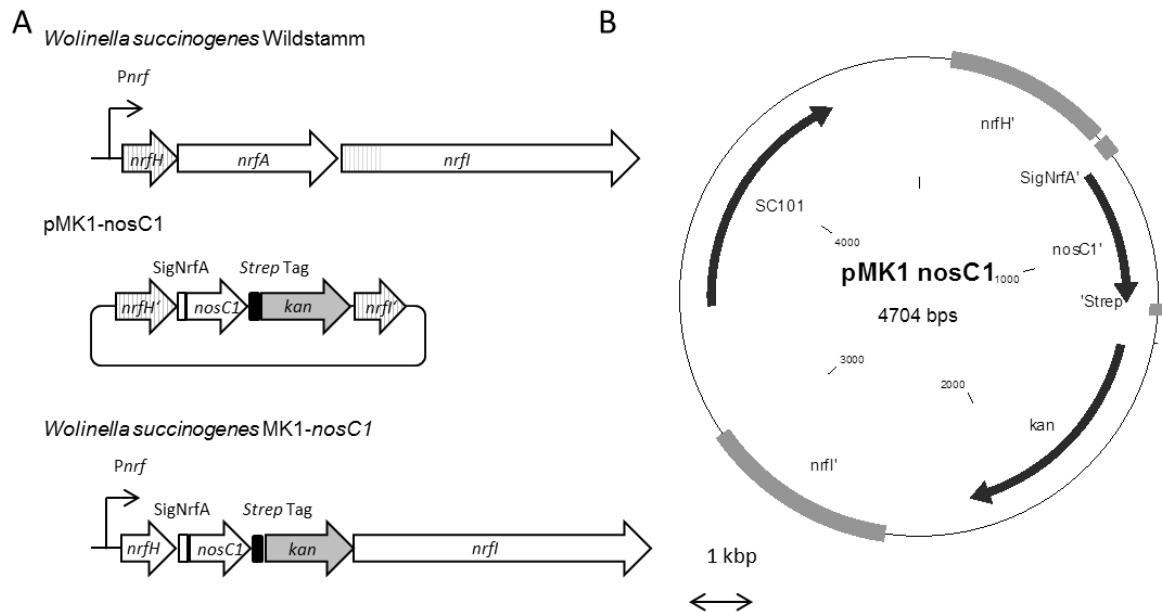


Abb. 29: A) Klonierungsstrategie zur Erstellung des Stammes *W. succinogenes* MK1-nosC1 durch Transformation von *W. succinogenes* Wildstamm mit pMK1-nosC1 B) Vektorkarte von pMK1-nosC1

Die Konstruktion der Stämme *W. succinogenes* MK1-nosC1 und *W. succinogenes* MK1-nosC2 erfolgte nach einem identischen Protokoll und wird aus diesem Grund zusammen wiedergegeben. Als Matritze wurde das Plasmid pMK1 verwendet. Mit Hilfe der beiden Primer nosC1 BsaI-F (2) und nosC1 BsaI-R beziehungsweise nosC2 BsaI-F (2) und nosC2 BsaI-R (Tabelle 4) wurde ein Fragment mit dem *nosC1* bzw. *nosC2* Gen amplifiziert. Nach der Restriktion erfolgte die Ligation über die *BsaI*-Schnittstelle in den zuvor restringierten Vektor. Die Überprüfung der Vektoren pMK1-nosC1 und pMK1-nosC2 mittels Sequenzierung wurde mit den Primern SeqMK-F und SeqMK-R durchgeführt. Die Plasmide wurden durch Transformation in Zellen von *W. succinogenes* *napA::cat* eingebracht. In *W. succinogenes* *napA::cat* ist die periplasmatische Nitratreduktase durch die Chloramphenicolgenkassette unterbrochen und inaktiviert. Die resultierenden Transformanten wurden mit dem Antibiotika Kanamycin selektiert und hinsichtlich der doppelt homologen Rekombination mit Hilfe der Primer PCR755 und ycf-24 in einer PCR bestätigt. Die Stämme wurden als *W. succinogenes* MK1 *nosC1* und *W. succinogenes* MK1 *nosC2* bezeichnet.

Die Zellen wurden in Formiat/Fumarat-Medium vermehrt und anschließend in lösliche und unlösliche Fraktionen separiert. Die lösliche Fraktion wurde auf eine *Strep*-Tactin-Säule aufgetragen. Affinitätsmarkierte Proteine wurden weder im Durchlauf noch in den Waschfraktionen mittels des Antikörper Konjugates gegen *Strep*-Tag II detektiert. Eine rötliche Färbung der Eluate konnte ebenfalls nicht beobachtet werden, ebenso wenig ein Signal auf der Höhe der berechneten Größe der Monohäm Cytochrome *c* in der Coomassie- oder Immunfärbung (Daten nicht gezeigt).

#### 4.5.3. Heterologe Produktion von NosC1 und NosC2 in *Escherichia coli*

Ein weiterer Ansatz zur Produktion der Monohäm Cytochrome c NosC1 und NosC2 war die heterologe Produktion in *E. coli*. Dabei wurden zwei verschiedene Induktionssysteme gewählt (Tabelle 2). Das Plasmid pPR-IBA1 besitzt einen T7-Promoter, weshalb ein Expressionsstamm mit einer T7 RNA-Polymerase benötigt wird. Dieses System ist für eine starke Überexpression des gewünschten Gens bekannt, jedoch auch für die mögliche Bildung von Protein-Einschlusskörpern. Des Weiteren bedeutet die sogenannte Basaltranskription eine unnötige metabolische Belastung für den Produktionsorganismus. Um diese möglichen Probleme zu vermeiden, wurde ein zweites System, welches mit Hilfe von Anhydrotetracyclin (AHT) aktiviert wird, verwendet (pASK-IBA2). Die Überexpression ist hier deutlich geringer, wodurch die Wahrscheinlichkeit von Einschlusskörpern sinkt (Skerra, 1994). Darüber hinaus ist keine Basaltranskription vorhanden.

Da sowohl NosC1 als auch NosC2 als lösliche Proteine produziert werden sollten, wurde dem Plasmid pPR-IBA1 zunächst eine OmpA Signalsequenz für den periplasmatischen Export hinzugefügt. Diese wurde zusammen mit der „multiple cloning site“ (MCS) mittels der Restriktionsenzyme *Xba*I und *Hind*III aus pASK-IBA2 herausgeschnitten und das 193 bp große Fragment über Gelextraktion gereinigt. pPR-IBA1 wurde ebenfalls mit *Xba*I und *Hind*III restringiert. Das dabei entstandene kleinere Fragment mit 154 bp enthielt die MCS. Das größere Fragment mit 2712 bp wurde über Gelextraktion gereinigt. Beide gereinigten Fragmente wurden ligiert und die Sequenz mit Hilfe von pPR-IBASeq-Rev bestätigt. Das Plasmid pPR-IBA1-OmpA verfügt über dieselbe MCS wie pASK-IBA2, weshalb nur ein Primerpaar pro Gen für beide Expressionsplasmide benötigt wird (Abb. 30).

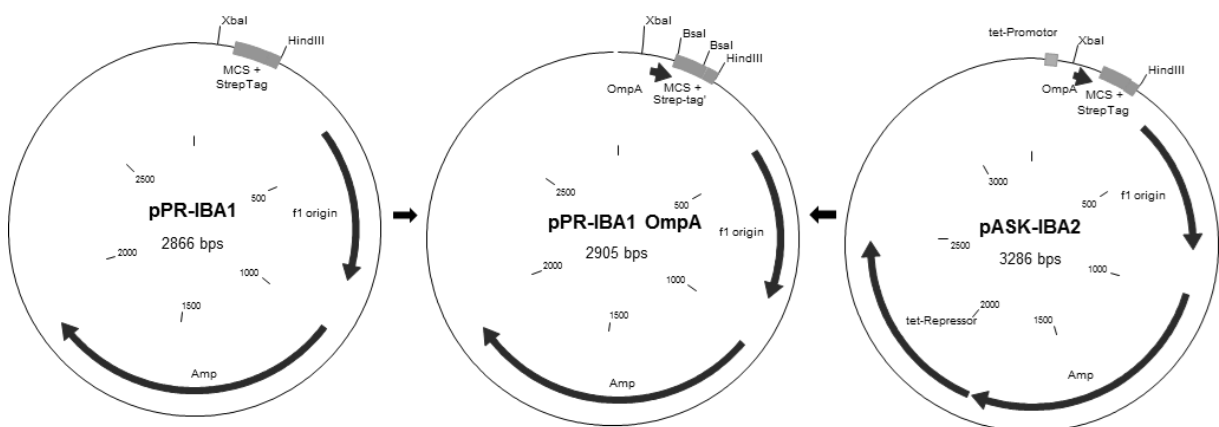


Abb. 30: Karten der verwendeten Plasmide zur Konstruktion von pPR-IBA1 OmpA aus dem Plasmidgerüst von pPR-IBA1 und der Signalsequenz einschließlich „multiple cloning site“ von pASK-IBA2.

Eine aerobe Produktion von Cytochromen c wird durch das Plasmid pEC86 ermöglicht. Dieses kodiert für das *E. coli* eigene *ccm* Gencluster und wird konstitutiv exprimiert. *E. coli* BL21 (DE3) pEC86 Zellen wurden für alle Induktionsexperimente verwendet. Auf andere

---

Expressionsstämme wird explizit hingewiesen. Wachstum und Produktion wurden zunächst im 5 ml Maßstab getestet.

#### 4.5.3.1 Heterologe Produktion von *W. succinogenes* NosC1 und NosC2

Für die Konstruktion der Plasmide pIBA1-OmpA *nosC1*, pIBA1-OmpA *nosC2*, pIBA2-*nosC1* und pIBA2-*nosC2* wurde jeweils die Länge der *W. succinogenes* eigenen Signalsequenz mittels des Programms PrediSi ([www.predisi.de](http://www.predisi.de)) bestimmt. Für NosC1 betrug die berechnete Signalsequenz 21 Aminosäuren (MRREWVVIWVALMLGLSGCDS) und für NosC2 22 Aminosäuren (MKTGQIITLAMGGVVVALMLYV). Die entsprechend der ermittelten Schnittstelle abgeleiteten Primerpaare nosC1 BsaI f und nosC1 BsaI r, sowie nosC2 BsaI f und nosC2 BsaI r amplifizierten das *nosC1* bzw. *nosC2* Gen vom *W. succinogenes* Genom ohne die native Signalsequenz, welches mit BsaI restringiert wurde. Die Ligation erfolgte mittels überhängender Enden mit dem zuvor geschnittenen Plasmid pPR-IBA1-OmpA bzw. pASK-IBA2. Die Überprüfung der Konstrukte erfolgte mittels Sequenzierung mit dem Primer IBASeq-For oder OmpA-F. Die Transformation von kompetenten *E. coli* BL21 (DE3) pEC86 Zellen erfolgte mit den Expressionsplasmiden pIBA1-OmpA *nosC1*, pIBA1-OmpA *nosC2*, pIBA2-*nosC1* und pIBA2-*nosC2*. Mit einer frischen Übernachtskultur wurden die Induktionskulturen inokuliert und die Proteinproduktion bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen getestet. Der entsprechende Induktor (IPTG bzw. AHT) wurde bei einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 hinzugegeben. Als Negativkontrolle für den späteren Vergleich der Produktion wurde jeweils jeder der Ansätze unter denselben Bedingungen, jedoch ohne IPTG- oder Anhydrotetracyclin-Zugabe kultiviert. Ein Einfluss der Induktion auf die Verdopplungszeiten oder der finalen optischen Dichte bei den gewählten Temperaturen konnte nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Erntezeitpunkte variierten je nach Inkubationsbedingung, was dem verlangsamten Wachstum der Zellen bei niedrigeren Temperaturen geschuldet war. So erfolgte bei 37 °C die Entnahme von Proben nach 3, 6 und 20 h, bei 28 °C nach 6 und 20 h sowie bei 20 °C nach 20 h. Die Zellen, bei denen die Expression induziert wurde, wiesen keine rötliche Färbung auf, welche auf eine erfolgreiche Überproduktion der Cytochrome c hingedeutet hätte. Mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung konnte keine Produktion von NosC1 oder NosC2 unter den getesteten Bedingungen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Auf Grund dessen wurden die Induktionskulturen mit einer 0,4‰ Eisen-Vitamin-Lösung (Kapitel 3.6.7.) versetzt, welche die mögliche Anhäufung von Apocytochrom im Periplasma verringern sollte. Die erwartete Größe des Holocytochroms von NosC1 beträgt 20,1 kDa, von NosC2 15,9 kDa. Abb. 31 zeigt Coomassie gefärbte SDS-Gele von allen 4 Ansätzen bei

verschiedenen Temperaturen 20 h nach der Induktion. Bei pIBA2-OmpA *nosC1* ist ein schwaches Signal bei 19 kDa bei allen drei getesteten Temperaturen zu erkennen, welches in den nicht induzierten Proben fehlt (Abb. 31 B siehe Pfeile). Eine Produktion von NosC2 ist augenscheinlich nicht zu beobachten. Die Überprüfung auf ein Holocytochrom erfolgte mittels Hämfärbung von allen Proben. Ein Protein der erwarteten Größe von NosC1 und NosC2 konnte jedoch nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

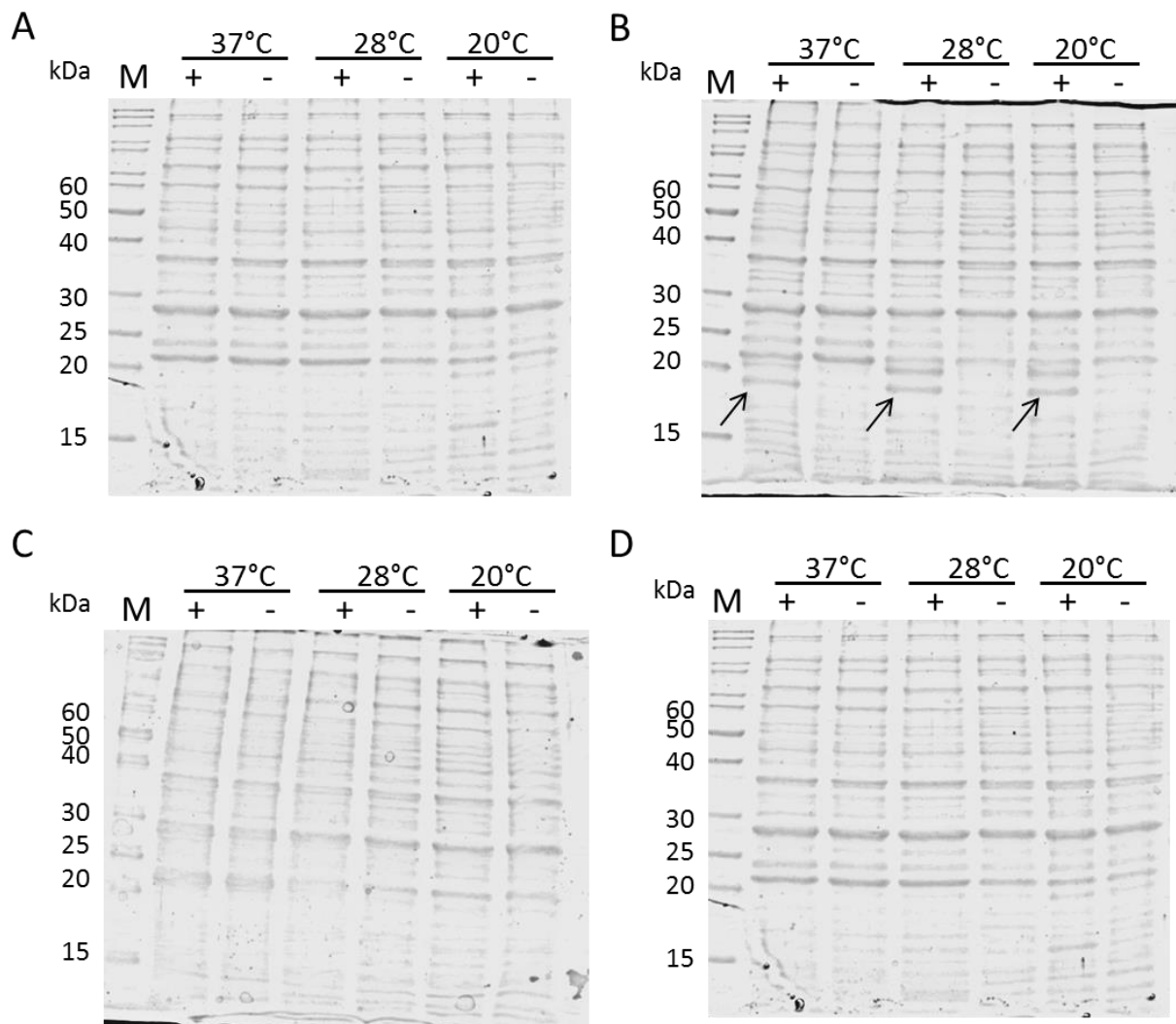


Abb. 31: Auftrennung von 20 µg des Gesamtproteins von *E. coli*-Induktionskulturen pro Spur zum Nachweis der Produktion von NosC1 und NosC2 mittels SDS-PAGE (15% ig); gefärbt mit Coomassie; Kulturen waren mit einer 0,4% Eisen-Vitamin-Lösung versetzt; (A) pIBA1-OmpA *nosC1* (B) pIBA2 *nosC1* (C) pIBA1-OmpA *nosC2* (D) pIBA2 *nosC2*; Die Induktion erfolgte entweder mit IPTG (A, C) oder mit Anhydrotetracyclin (B, D). Minus(-): nicht induzierte Kulturen; Plus (+): induzierte Kulturen; M: PageRuler Unstained Protein Ladder (Fermentas); Die Pfeile markieren das heterolog produzierte Protein NosC1.

Die Analyse von Induktionskulturen mit IBA2-*nosC1* mittels Immunfärbung zeigt das Vorhandensein von drei Proteinen mit einer Größe von etwa 17 kDa, 21 kDa und 22 kDa auf (Abb. 32). Eine Färbung in den Kontrollen ist nicht zu beobachten, weswegen es sich bei allen



Signalen um eine spezifische Reaktion des Antikörper Konjugates gegen *Strep*-Tag II handelt. Mit der angefügten *E. coli* Signalsequenz OmpA und dem *Strep*-Tag beträgt die berechnete Größe von NosC1 ohne die Molekülmasse einer Häm-Gruppe 21,6 kDa. Dementsprechend stellen die oberen Signale wahrscheinlich die nicht-prozessierte Form des Zielproteins mit C-terminalen OmpA-Signalpeptid dar, das untere deutlich schwächere Signal könnte das gesuchte prozessierte NosC1 sein. Ein Signal bei der erwarteten Größe in der Hämfärbung konnte nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

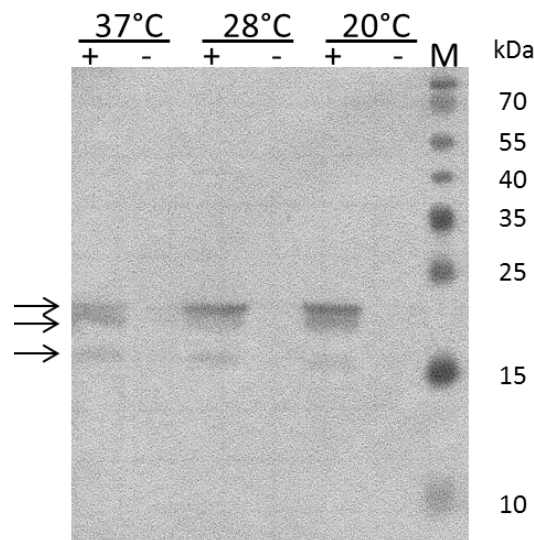


Abb. 32: Nachweis von NosC1 mit *Strep*-Tag mittels eines Antikörper Konjugates gegen *Strep*-Tag II nach Auftrennung in einem 15% igem Polyacrylamid-Gel und anschließendem Western Blot; 50 µg Gesamtprotein in jeder Spur von *E. coli* BL21 (DE3) pEC86 Zellen mit pIBA2-*nosC1* bei 37 °C, 28 °C und 20 °C; Induktion der Produktion erfolgte mit Anhydrotetracyclin; Minus(-): nicht induzierte Kultur; Plus (+): induzierte Kultur; Spur M: 2,5µl PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas)

Ein weiterer Ansatz zur Produktion von NosC1 und NosC2 war die Supplementierung des Mediums mit  $\delta$ -Aminolävulinat. Dieses Molekül ist ein von den Zellen aufnehmbarer Metabolit des Häm-Biosyntheseweges. Eine externe Bereitstellung soll die metabolische Belastung für den Organismus verringern. Die Transformation von kompetenten *E. coli* BL21 (DE3) pEC86 Zellen erfolgte mit den Expressionsplasmiden pIBA1-OmpA *nosC1*, pIBA1-OmpA *nosC2*, pIBA2-*nosC1* und pIBA2-*nosC2*. Mit einer frischen Übernachtskultur wurden die Induktionskulturen inokuliert und die Proteinproduktion unter den oben beschriebenen Bedingungen getestet. Das Medium war sowohl mit 0,4‰ Eisen-Vitamin-Lösung als auch mit 0,9 mM  $\delta$ -Aminolävulinat versetzt (Kapitel 3.6.7.). Die Überprüfung auf eine Produktion erfolgte mittels Immunfärbung. Es konnte jedoch nur bei pIBA2-*nosC1* (Spur 1) bei 20 °C eine entsprechende Bande detektiert werden (Abb. 33 A). Im Vergleich zu den nicht induzierten Kulturen war die Färbung des Zellpellets ein wenig dunkler (Daten nicht gezeigt). Um ausreichend Zellmasse für eine Aufreinigung zu erhalten, erfolgte die Anzucht einer 50 ml

Kultur. Die Zellen wurden geerntet und in lösliche und unlösliche Fraktion separiert. Die anschließende Immunfärbung ergab ein Signal bei der erwarteten Größe von NosC1 im Zellhomogenat sowie in der unlöslichen Fraktion (Abb. 33 B). Eine Überprüfung auf das entsprechende Holocytochrom mittels Hämfärbung fiel negativ aus (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise liegt das Apocytochrom in Einschlusskörpern vor.

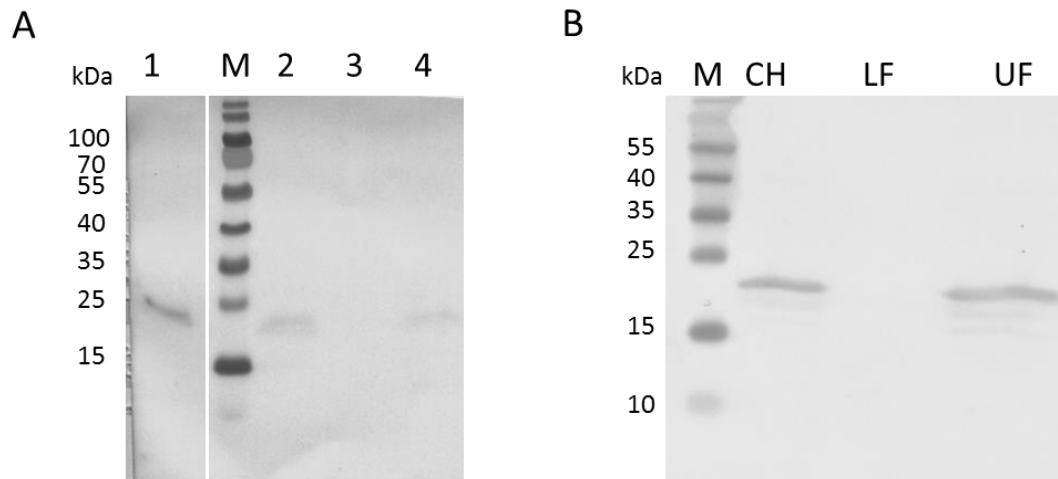


Abb. 33: Nachweis von Proteinen mit *Strep*-Tag über ein Antikörper Konjugat gegen *Strep*-Tag II nach Auftrennung in einem SDS-Gel und anschließendem Western Blot. (A) 12,5% iges Polyacrylamid-Gel mit 100 µg Gesamtprotein von *E. coli* BL21 (DE3) pEC86 Induktionskulturen in jeder Spur; Inkubationstemperatur 20 °C; Spur 1: pIBA2-*nosC1*; Spur 2: pIBA2-*nosC2*; Spur 3: pIBA1-OmpA *nosC2*; Spur 4: pIBA1-OmpA *nosC1*; Spur M: 5µl PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas) (B) 15% iges Gel mit 100 µg Gesamtprotein von *E. coli* BL21 (DE3) pEC86 pIBA2-*nosC1* in jeder Spur; CH: Zellhomogenat; LF: lösliche Fraktion; UF: Membranfraktion. Spur M: 5µl PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas)

#### 4.5.3.2. Heterologe Produktion von NosC1 aus *Denitrovibrio acetiphilus* und *Sulfurimonas denitrificans*

Als Alternative zu den beiden Monohäm Cytochromen c NosC1 und NosC2 aus *W. succinogenes* wurden homologe Proteine gesucht. Sowohl *Denitrovibrio acetiphilus* (DSMZ 12809) als auch *Sulfurimonas denitrificans* (DSMZ 1251) kodieren neben einem atypischen NosZ jeweils für 2 hypothetische Proteine mit einem Häm c-Bindemotiv im *nos*-Gencluster (Abb. 39; Kiss *et al.*, 2010; Sanford *et al.*, 2012; Sievert *et al.*, 2008). Die Möglichkeit der Produktion sollte zunächst mit einem Monohäm Cytochrom c unter einem induzierbaren Promotor getestet werden. Die Auswahl basierte auf den Ergebnissen der vorherigen Induktionsexperimente, bei welchen mit *nosC1* unter dem *tet*-Promotor das Apoprotein nachgewiesen wurde (Abb. 31 B). Die Eigenschaften der Proteine NosC1 von *W. succinogenes*, *D. acetiphilus* und *S. denitrificans* sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Eigenschaften von NosC1. Die Länge der Aminosäuresequenz bezeichnet das nicht prozessierte Apoprotein. Die Berechnung der Molekülmasse erfolgte mittels des Programms Clone Manager, wobei die Masse der Häm-Gruppe nicht berücksichtigt wurde.

	<i>W. succinogenes</i>	<i>D. acetiphilus</i>	<i>S. denitrificans</i>
Länge der DNA-Sequenz	554 bp	528 bp	612 bp
Länge der Aminosäuresequenz	184 aa	175 aa	203 aa
Länge der Signalsequenz	21 aa	19 aa	22 aa
Molekülmasse mit Signalsequenz	20,8 kDa	19,7 kDa	22,7 kDa
Molekülmasse ohne Signalsequenz	18,4 kDa	17,5 kDa	20,3 kDa
Häm c-Bindemotiv	CSACH	CAPCH	CSACH

Als Matritze für die Konstruktion der Plasmide pASK-IBA2 *Suden\_1302* und pASK-IBA2 *Dacet\_0945* diente pASK-IBA2. Die Länge der jeweiligen Signalsequenz (Tabelle 10) wurde mittels des Programms PrediSi ([www.predisi.de](http://www.predisi.de)) bestimmt und die Primer entsprechend der ermittelten Schnittstelle abgeleitet. Mit *Suden\_1302* F *BsaI* und *Suden\_1302* R *BsaI* beziehungsweise *Dacet\_0945* F *BsaI* und *Dacet\_0945* R *BsaI* wurde das gewünschte Genfragment vom Genom ohne die native Signalsequenz amplifiziert. Das gereinigte Fragment sowie das Plasmid wurden mit *BsaI* geschnitten, ligiert und kompetente *E. coli* Zellen mit dem Plasmid transformiert. Die Bestätigung der gewünschten Sequenz der Konstrukte erfolgte mittels Sequenzierung mit den Primern pASK-IBA Seq-F und pASK-IBA Seq-R.

Wachstum und Produktion wurden zunächst mit *E. coli* BL21 (DE3) pEC86 Zellen im 5 ml Maßstab getestet. Auf Grund der Resultate vorangegangener Experimente wurde die Produktion unter zwei verschiedenen Temperaturbedingungen, 20 °C und 28 °C, überprüft. Zusätzlich wurden Ansätze mit 0,4‰ Eisen-Vitamin-Lösung oder 0,9 mM  $\delta$ -Aminolävulinat getestet, welche die Verfügbarkeit von Häm durch die Supplementierung mit Eisen bzw. Vorstufen der Porphyrinring-Synthese sichern sollten. Unterschiede im Wachstumsverhalten von induzierten *E. coli* Kulturen im Vergleich zu nicht induzierten Kulturen, bedingt durch die Zusätze oder die heterologe Produktion, konnten nicht beobachtet werden. Die Entnahme von Proben erfolgte bei 20 °C nach 15 h, bei 28 °C nach 5 und 19 h. Eine rötliche Färbung der Pellets war bei keiner der Proben zu erkennen. Die Analyse der Produktion erfolgte mittels Immunfärbung und ist in Abb. 34 dargestellt. Während bei 20 °C (Abb. 34 A) keine Produktion für *S. denitrificans* NosC1 detektierbar ist, ist deutlich ein Signal bei etwa 23 kDa von *D. acetiphilus* NosC1 19 h nach der Induktion nachweisbar. Die berechnete Größe des Holocytochroms mit angefügtem *Strep*-Tag beträgt 19,2 kDa. Ein Vergleich der Bandenstärke

zwischen den induzierten Proben mit und ohne Zusatz einer Eisen-Vitamin-Lösung oder Aminolävulinat zeigt auf, dass diese keinen fördernden Einfluss auf die Produktion zu haben scheinen. Im Gegensatz dazu ist bei 28 °C (Abb. 34 B) ein Signal auf der Höhe der berechneten Größe des Holocytochroms mit angefügtem *Strep*-Tag von 22,0 kDa für *S. denitrificans* NosC1 nur in der Induktionskultur ohne Zusätze erkennbar. Offensichtlich hat die Supplementierung hier einen negativen Effekt. Eine Überprüfung auf das entsprechende Holocytochrom mittels Hämfärbung fiel jedoch negativ aus (Daten nicht gezeigt). Mittels Immunfärbung gelang demnach lediglich der Nachweis des Präproteins, welches möglicherweise in Einschlusskörpern vorliegt.

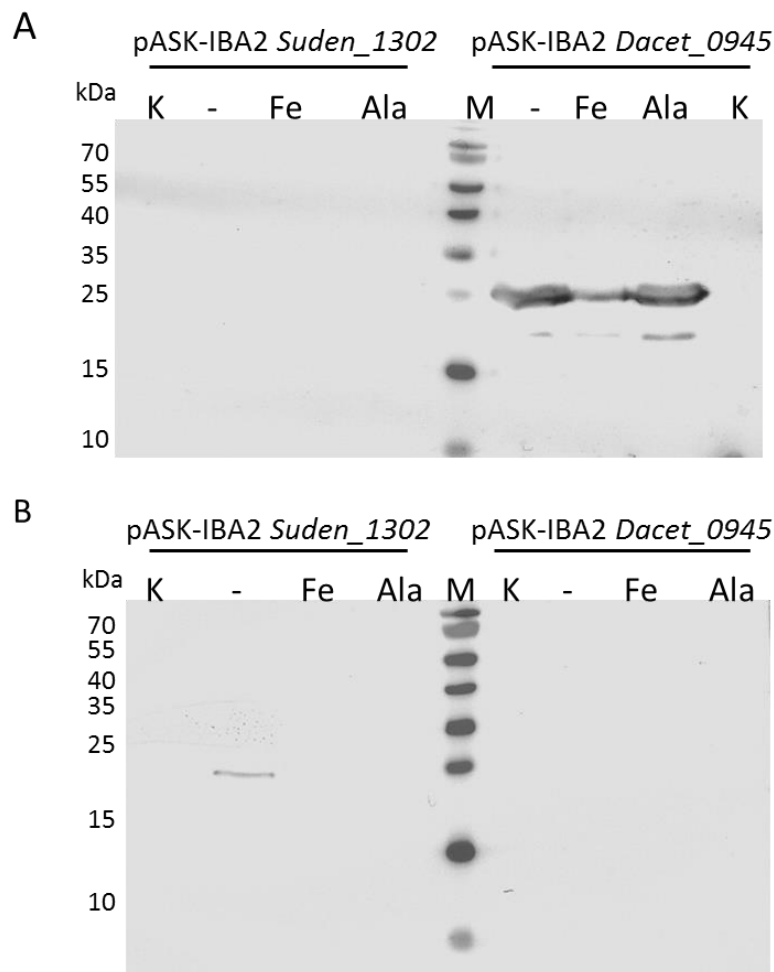


Abb. 34: Nachweis von Proteinen der angegebenen *E. coli* Kulturen mit *Strep*-Tag über ein Antikörper Konjugat gegen *Strep*-Tag II nach Auftrennung in einem 15% igem Polyacrylamid-Gel und anschließendem Western Blot. 50 µg Gesamtprotein wurde in jeder Spur aufgetragen; die Induktion der Produktion in *E. coli* BL21 (DE3) pEC86 Zellen erfolgte mit Anhydrotetracyclin. Spur K: Kontrolle ohne Induktion und ohne Zusätze ins Medium; Spur -: Induktion aber ohne Zusätze ins Medium; Spur Fe: Induktion und Supplementierung mit 0,4‰ Fe-Lösung; Spur Ala: Induktion und Supplementierung mit 0,9 mM Aminolävulinat; Spur M: 5µl PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas) (A) Wachstum bei 20 °C (B) Wachstum bei 28 °C (Proben nach 19 h)

## 4.6. NosB

Bioinformatische Analysen von Genclustern, welche für ein atypisches *nosZ* kodieren, zeigten ein konserviertes hypothetisches Gen namens *nosB* auf (Abb. 39; Sanford *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 2013). Dieses Gen ist in allen untersuchten Genclustern immer direkt stromabwärts von *nosZ* lokalisiert. NosB ist vermutlich ein transmembranes Protein mit 4 vorhergesagten transmembranen Helices. Die Funktion von NosB ist bislang unbekannt. Durch ein Proteinalignment (Kapitel 7.1. Alignment Nr. 1) konnten Sequenzabschnitte mit einer 100% igen Übereinstimmung ermittelt werden (rot markierte Bereiche). Diese liegen auf Grund der vorhergesagten Orientierung der Helices in der Membran auf der cytoplasmatischen Seite (Bestimmung durch das Programm TMHMM Server v. 2.0).

### 4.6.1. Heterologe Produktion von NosB in *Escherichia coli*

Das Membran-gebundene Protein NosB sollte in *E. coli* heterolog produziert werden. Dafür wurden von Sabine Zeidler (Bachelorarbeit, 2012) zwei Plasmide pPR1-*nosB* und pASK3-*nosB* konstruiert (Abb. 35; Tabelle 2). Das Plasmid pPR1-*nosB* besitzt einen T7-Promotor, während pASK3-*nosB* einen *tet*-Promotor enthält. Aus Zeitgründen konnte während der Bachelorarbeit lediglich ein Induktionsversuch bei 18 °C durchgeführt und ausgewertet werden. Im ELISA wurde dabei eine Bande bei 26 kDa detektiert. Die mittels des Clone Manager berechnete Größe von NosB-Strep beträgt 31 kDa.

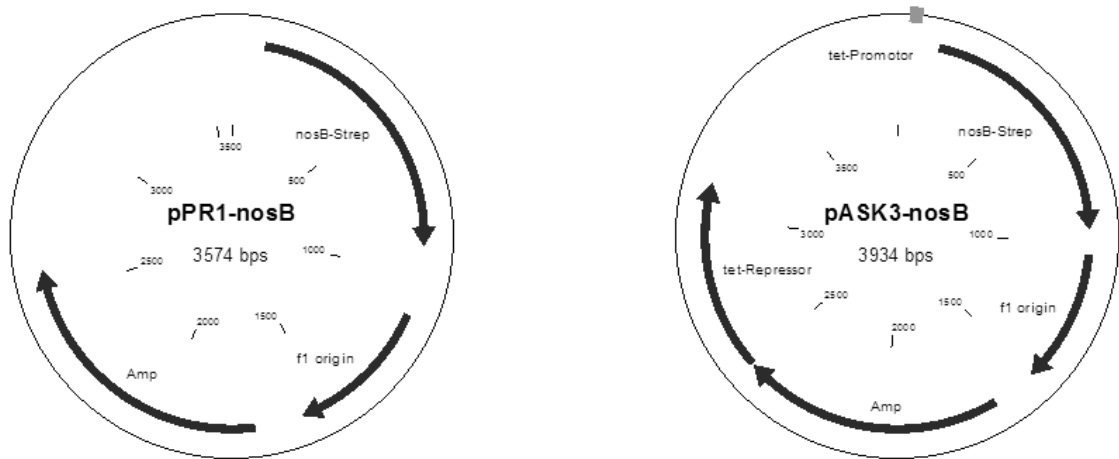


Abb. 35: Vektorkarten von pPR1-*nosB* und pASK3-*nosB*

Die Transformation von kompetenten *E. coli* BL21 (DE3), C41 bzw. C43 Zellen erfolgte mit den oben genannten Plasmiden pPR1-*nosB* und pASK3-*nosB*. Die Inkubationstemperatur betrug 37 °C, 28 °C und 18 °C. Bei einer optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm von 0,6 erfolgte die Induktion mit IPTG (0,5 mM) bzw. AHT (0,4 µM). Die Erntezeitpunkte variierten je nach Inkubationsbedingung, was dem verlangsamten Wachstum der Zellen bei

---

niedrigeren Temperaturen geschuldet war. So erfolgte bei 37 °C die Entnahme von Proben nach 3 h, bei 28 °C nach 6 h und bei 20 °C nach 20 h. Die Produktion von *NosB-Strep* wurde mittels Immunfärbung überprüft und bestätigte die Daten von Frau Zeidler (Abb. 36 A). Ein Vergleich der Produktion von *NosB-Strep* in den ausgewählten *E. coli* Stämmen BL21 (DE3), C41 und C43 ließ keinen Unterschied erkennen (Abb. 36 B). Auf Grund dessen wurde BL21 (DE3) als Expressionsstamm für die weitere Arbeit verwendet. Der Vergleich der Immunfärbung zeigte zudem, dass im gesamten getesteten Temperaturbereich das Zielprotein nachweisbar ist, jedoch bei 18 °C eine größere Proteinausbeute vorliegt (Abb. 36 B). Des Weiteren konnte eine höhere Ausbeute unter dem *tet*-Promotor beobachtet werden. In *E. coli* C41 PR-IBA1-*nosB* Kulturen konnte im getesteten Temperaturbereich mittels Immunfärbung neben *NosB-Strep* ein weiteres Protein nachgewiesen werden (Abb. 36 A). Dieses Protein ist auch in *E. coli* C41 Kontroll-Kulturen vorhanden, welche ein leeres PR-IBA1 Plasmid besitzen (Zeidler, 2012). Dabei handelt es sich um das *E. coli* eigene „biotin carboxyl carrier protein“ (BCCP) mit einer Größe von 22 kDa (IBA GmbH). Des Weiteren konnte eine konstante Produktion von *NosB-Strep* unabhängig von der Zugabe des Induktors IPTG aufgezeigt werden. Dies ist vermutlich auf die zuvor beschriebene Basaltranskription zurückzuführen.

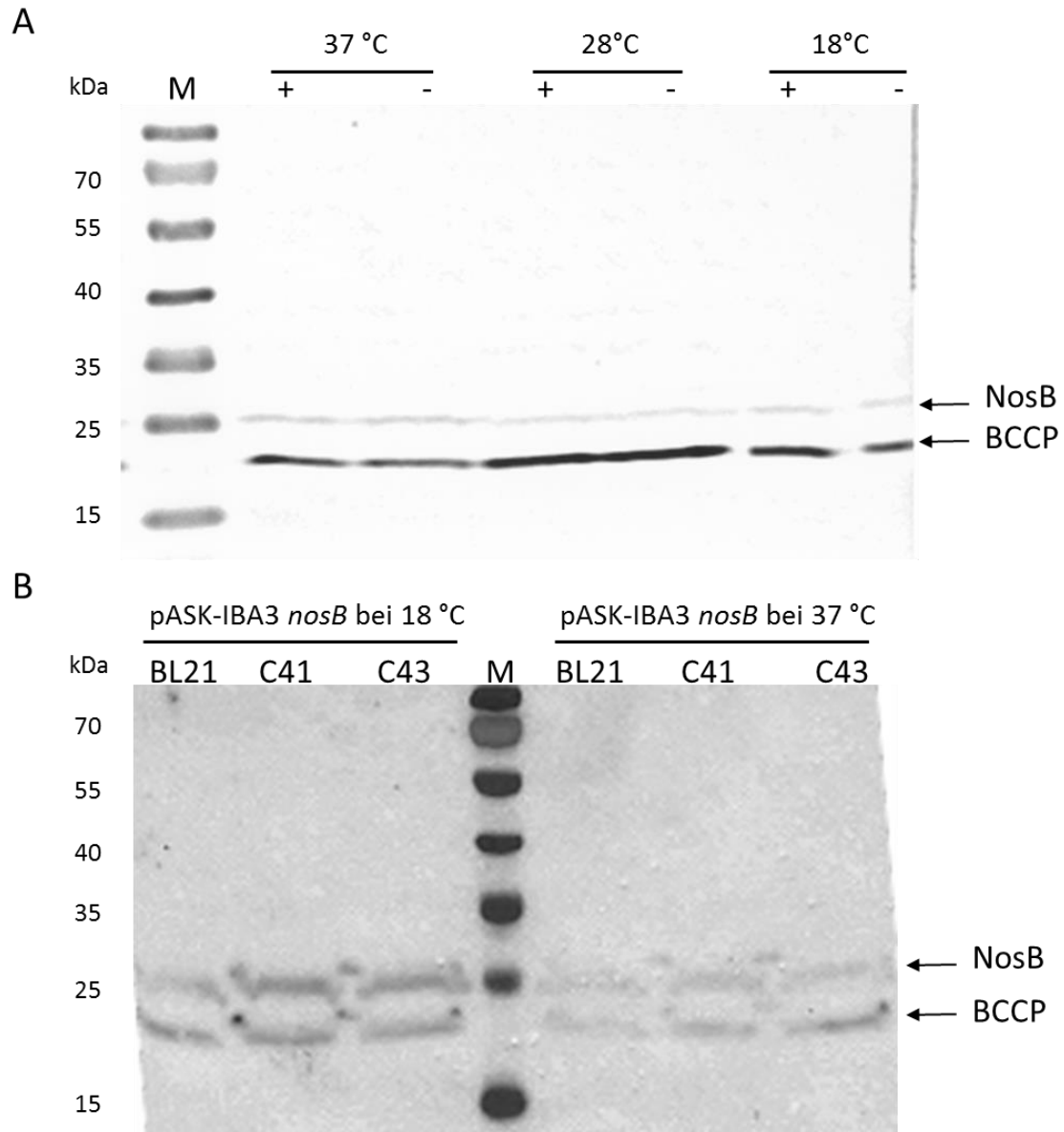


Abb. 36: Nachweis von Proteinen mit *Strep*-Tag über ein Antikörper Konjugat gegen *Strep*-Tag II nach Auftrennung in einem 12,5% igem Polyacrylamid-Gel und anschließendem Western Blot. 50 µg Gesamtprotein wurde in jeder Spur aufgetragen; (A) Wachstum von *E. coli* C41 pPR-IBA1 *nosB* bei 37 °C, 28 °C und 18 °C. Spur M: 5µl PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas); Spur +: Induktion mit 0,5 mM IPTG; Spur -: keine Induktion (B) Wachstum von *E. coli* BL21, C41 und C43 pASK-IBA3 *nosB* bei 18 und 37 °C. Die Induktion der Produktion in *E. coli* Zellen erfolgte mit Anhydrotetracyclin (0,4 µM); Spur M: 5µl PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas); BCCP: biotin carboxyl carrier protein

Vergleicht man die gebildeten Mengen an NosB mehrerer Produktionskulturen fällt auf, dass diesbezüglich enorme Schwankungen auftraten (Abb. 37 A). Die erfolgreiche Produktion des Zielproteins von jeder Induktionskultur wurde im Western Blot mit anschließender Immunfärbung kontrolliert. Dabei konnte in parallel induzierten Kulturen, welche mit Zellen aus derselben Übernachtskultur induziert wurden, das Zielprotein NosB nicht immer nachgewiesen werden. Lediglich in 33% der Induktionskulturen konnte NosB-*Strep* nachgewiesen werden. Variationen bezüglich der optischen Dichte bei der Zugabe des

Induktors oder des Volumens der Induktionskulturen führten zu keiner konstanten Produktion.

#### 4.6.2. Lokalisierung von NosB

Zur Bestimmung der Lokalisation von NosB wurden die BL21 (DE3) pIBA3-*nosB* Kulturen im 50 ml Maßstab bei 20 °C kultiviert. 20 h nach der Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und in Puffer resuspendiert. Eine Überprüfung der Produktion von NosB-*Strep* mittels Immunfärbung zeigte, dass lediglich in der Induktionskultur bei 20 °C das Zielprotein gebildet wurde (Abb. 37 A). Nachweisbar war auch das *E. coli* eigene BCC-Protein bei etwa 22 kDa (IBA GmbH). Die Zellsuspension dieser Induktionskultur wurde mittels French Press aufgeschlossen und in lösliche und unlösliche Fraktionen separiert. Im Anschluss erfolgte die Analyse des Zellhomogenates (CH), der löslichen (LF) und der unlöslichen (UF) Fraktion mittels Immunfärbung (Abb. 37 B). Obwohl in den ganzen Zellen noch ein Signal bei der Größe von etwa 26 kDa detektiert wurde, waren nach dem Zellaufschluss zwei Signalbanden im Bereich von etwa 22 kDa und 17 kDa nachweisbar. Vermutlich handelt es sich hierbei um ein Abbauprodukt von NosB-*Strep*.

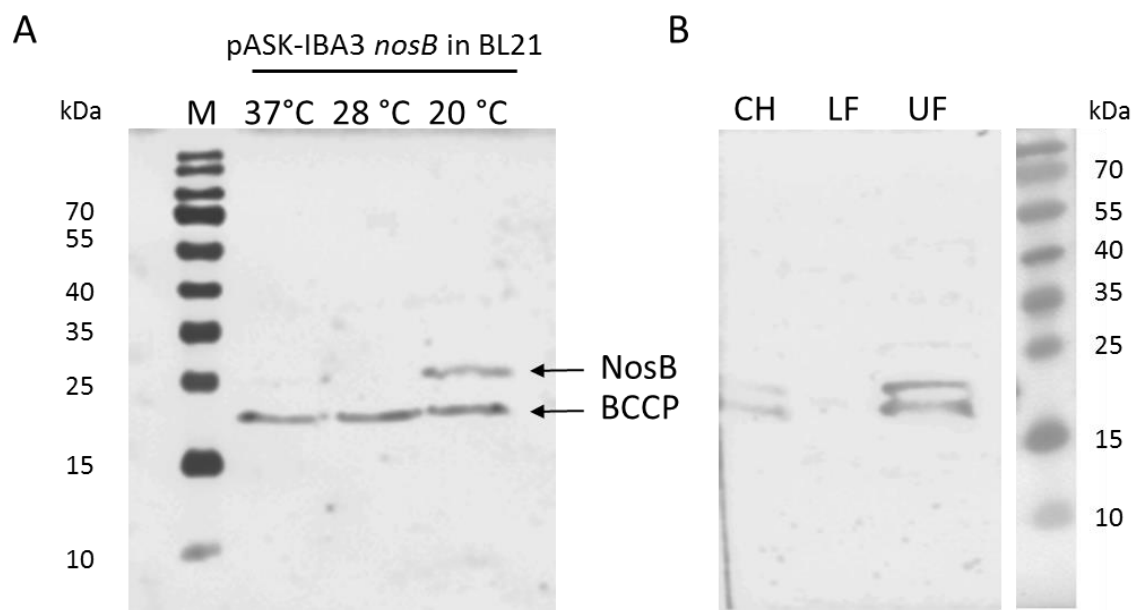


Abb. 37: Nachweis von Proteinen der angegebenen *E. coli* Kulturen mit *Strep*-Tag über ein Antikörper Konjugat gegen *Strep*-Tag II nach Auftrennung in einem 12,5% igem SDS-Gel und anschließendem Western Blot; 100 µg Gesamtprotein wurde in jeder Spur aufgetragen; A) Inkubationstemperatur von 37, 28 und 20°C; BCCP: biotin carboxyl carrier protein; B) Analyse von Zellhomogenat (CH), lösliche Fraktion (LF) und: Membranfraktion (UF) von *E. coli* Induktionskultur bei 20 °C Inkubationstemperatur; Spur M: 5µl PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas)



---

## 5. Diskussion

---

### 5.1. Produktion und Verbrauch von NO in Nitrat-ammonifizierenden Bakterien

Nitrat kann durch zwei funktionell verschiedene dissimilatorische Nitratreduktasen zu Nitrit reduziert werden. Beide Varianten unterscheiden sich bezüglich ihrer Lokalisation in verschiedenen Zellkompartimenten. Zum einen die Membran-gebundene Nitratreduktase (Nar), welche Nitrat zu Nitrit auf der cytoplasmatischen Seite der Membran reduziert, zum anderen die periplasmatische Nitratreduktase (Nap). Das entstandene Nitrit wird im Zuge des Denitrifikationsprozesses durch eine Kupfer-abhängige (NirK) oder eine Cytochrom *cd*<sub>1</sub> Nitritreduktase (NirS) zu Stickstoffmonoxid (NO) reduziert (siehe Kapitel 2.2.). Dieses toxische Intermediat wird durch eine Vielzahl von NO-Reduktasen zu Distickstoffmonoxid (N<sub>2</sub>O) reduziert (Arkenberg *et al.*, 2011, Watmough *et al.*, 2009; Spiro, 2012). Im Gegensatz dazu katalysiert in Ammonifizierern die Pentahäm Cytochrom *c* Nitritreduktase (NrfA) die Reduktion des Nitrits direkt zu Ammonium.

In dieser Arbeit wurde der NO und der N<sub>2</sub>O-Metabolismus im Nitrat-ammonifizierenden Bakterium *Wolinella succinogenes* untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass in allen wachsenden Kulturen NO zu detektieren war. Kontrollexperimente mit Medium ohne Zellen ergaben, dass ungefähr 95 % der detektierten NO-Konzentrationen aus einer Reaktion des Medium-Zusatzes Brain-Heart Infusion mit vorhandenem Nitrit entstand (Abb. 9). Eine chemische Reaktion von Nitrit mit weiteren Bestandteilen des Nitrat-haltigen Mediums wurde ebenfalls nachgewiesen (Abb. 10). Stickstoffmonoxid wurde auch während des Wachstums von *Salmonella enterica* serovar Typhimurim durch Nitrat-Ammonifikation nachgewiesen (Corker & Poole, 2003; Gilberthorpe & Poole, 2008; Rowley *et al.*, 2012). *Salmonella enterica* besitzt ebenfalls keine bislang bekannten respiratorischen NO-produzierenden Nitritreduktasen, verfügt jedoch über beide Nitratreduktase-Typen. Der Hauptteil der detektierten NO-Konzentration ist auf das NarG-Enzym zurückzuführen (Rowley *et al.*, 2012). Beide Enzyme, NarG und NapA, sind jeweils während der Nitrat-Ammonifikation hinsichtlich der Biomassebildung sowie des Nitrat- und Nitritumsatzes funktionell redundant, jedoch führt einzig die Deletion des *nar*-Genclusters zu einer stark verminderten NO-Produktion in wachsenden Kulturen. Die An- oder Abwesenheit der periplasmatischen Nitratreduktase scheint diesbezüglich keine Rolle zu spielen. Bei der Reduktion von Nitrit zu Ammonium durch die Pentahäm Cytochrom *c* Nitritreduktase (NrfA) entsteht neben Hydroxylamin auch Stickstoffmonoxid als Intermediat (Bykov *et al.*, 2014; Einsle *et al.*, 2002). Aufgrund des „Backbouding-Effektes“ bleiben beide Intermediate jedoch am zentralen Häm-Eisen(II)-Ion gebunden und werden nicht ins Periplasma entlassen. Im Widerspruch zu diesem postulierten Modell steht das Paper von Corker und Poole (2003). Untersuchungen in *E. coli* zeigten auf, dass NrfA für die Produktion

---

des toxischen Intermediates NO verantwortlich ist (Corker & Poole, 2003). Eine Freisetzung von NO durch *W. succinogenes* NrfA wurde bislang experimentell nicht bestätigt, kann aber auch nicht ausgeschlossen werden.

Unabhängig, ob NO biotisch oder abiotisch produziert wird, besitzt *W. succinogenes* jedoch wenigstens zwei Proteine, die an der Detoxifikation dieses toxischen Intermediates involviert sein könnten (Costa *et al.*, 1990; Kern *et al.*, 2011b). Zum einen ein Eisenflavoprotein (Fdp), und zum anderen die Cytochrom c Nitritreduktase (Hayashi *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2006; Saraiva *et al.*, 2004). In Hemmhoftests wurden Zellen der Stämme *W. succinogenes* Wildstamm, *W. succinogenes*  $\Delta fdp$ , *W. succinogenes*  $\Delta nrfHA$  und *W. succinogenes*  $\Delta fdp \Delta nrfHA$  in Fumarat-haltigen Agar eingegossen. Nach dem Aushärten der Platten wurden sterile Filterpapier-Plättchen auf die Agarplatte gelegt, welche in NO-generierenden Substanzen getränkt waren. Die Bestimmung der Hemmhofgröße erfolgte vom Plättchenrand bis zum Hemmhofrand. Dabei konnte gezeigt werden, dass NrfA und Fdp an der Abwehr von nitrosativem Stress in *W. succinogenes* beteiligt sind (Kern *et al.*, 2011b). Im Vergleich zu *W. succinogenes* Wildstamm nahm der Radius des Hemmhofs der Einzelmутanten *W. succinogenes*  $\Delta fdp$  und *W. succinogenes*  $\Delta nrfHA$  um 55% zu und ist in der Doppelmutante *W. succinogenes*  $\Delta fdp \Delta nrfHA$  doppelt so groß. Dies lässt auf eine redundante Funktion beider Proteine in der NO-Detoxifikation schließen. Die während dieser Arbeit durchgeführten Experimente in wachsenden Nitrat-ammonifizierenden Kulturen bestätigten diese vorherigen Ergebnisse nicht. Auf Grund der chemischen Dekomposition des akkumulierten Nitrits in Medien mit Brain-Heart Infusion Zusatz und wahrscheinlich auch mit weiteren Bestandteilen des Mediums wurde keine NO-detoxifizierende Wirkung erkannt. Zwar war es möglich in Kulturen von *W. succinogenes*  $\Delta nrfHA$  mehr als das Doppelte der NO Konzentration im Vergleich zu *W. succinogenes* Wildstamm zu detektieren (Abb. 20), jedoch kann dies durchaus auf die erhöhten Nitritkonzentrationen im Medium zurückzuführen sein. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Doppelmutante *W. succinogenes*  $\Delta fdp \Delta nrfHA$ , bei deren Wachstum es im Versuchszeitraum zu keiner NO-Akkumulation kam, obwohl auch hier eine vergleichbare Akkumulation von Nitrit zu detektieren war. Generell konnte unabhängig vom gewählten Medium im Vergleich zu *W. succinogenes* Wildstamm eine erhöhte NO Konzentration detektiert werden, was für einen verminderten NO-Abbau spricht, jedoch wurden gleichzeitig auch erhöhte N<sub>2</sub>O-Mengen im Medium gemessen. Dies spricht für ein zusätzliches NO detoxifizierendes Protein.

In *Helicobacter pylori* wurde ein neues Protein (NorH; Nomenklatur gemäß des Vortrages von Saraiva, 18th European Nitrogen Cycle Meeting, 2013) identifiziert, welches in der Abwehr von nitrosativem Stress involviert ist (Justino *et al.*, 2012). Zellen der entsprechenden

Deletionsmutante zeigten im Vergleich zu *Helicobacter pylori* Wildstamm eine um 50% verringerte NO-Verbrauchsaktivität. Ein homologes Protein zu NorH (Gen *HP0013*) wird in *W. succinogenes* durch das Gen *WS1903* kodiert. Dieses ist in einem Gencluster mit insgesamt drei offenen Leserahmen lokalisiert (Abb. 38). *WS1902* und *WS1904* sind hypothetische Gene, die noch nicht genauer charakterisiert worden sind. Die drei Leserahmen bilden vermutlich eine Transkriptionseinheit mit einer möglichen Promotorregion zwischen *WS1901* und *WS1902*. Die Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *WS1903* und *HP0013* ergibt eine 57% ige Identität beider Proteine. Ein Alignment von *WS1903* und *HP0013* befindet sich in Kapitel 7.1. (Alignment Nr. 2).

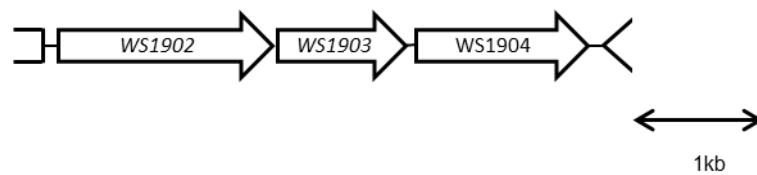


Abb. 38: Genkarte von *WS1903*

Ein mögliches Produkt der NO-Detoxifikation durch *WS1903* könnte  $N_2O$  sein. Dafür sprechen die erhöhten  $N_2O$ -Konzentrationen in den Kulturen von *W. succinogenes*  $\Delta fdp$   $\Delta nrfHA$  im Vergleich zu *W. succinogenes* Wildstamm (Abb. 20).

Zusätzlich kodiert *W. succinogenes* für ein cytoplasmatisch lokalisiertes Hybrid-Cluster-Protein (*WS1183*), welches sowohl in *Desulfovibrio vulgaris* in der nitrosativen Stress- als auch in *E. coli* K-12 in der oxidativen Stressabwehr involviert ist (Almeida *et al.*, 2006; Figueiredo *et al.*, 2013; Kern *et al.*, 2011b). In Hemmhofstests mit NO-generierenden Substanzen bzw. oxidischen Bedingungen zeigte die entsprechende Deletionsmutante in *W. succinogenes* jedoch einen vergleichbaren Phänotyp wie *W. succinogenes* Wildstamm (Kern *et al.*, 2011b). Das Hybrid-Cluster-Protein scheint daher in *W. succinogenes* nur eine untergeordnete Funktion in der Stressabwehr zu haben. Möglich ist auch eine Funktionsübernahme durch ein oder mehrere andere Proteine.

Zukünftig sollten bezüglich der NO-Detoxifikation vorrangig Experimente mit *W. succinogenes* Einzel- und Doppelmutanten der *nrf*, *fdp* und *norH*-Gene in Minimalmedium untersucht werden. Zu beachten ist, dass auch in Medien ohne Supplementierung eine bestimmte Menge an NO durch chemische Dekomposition entsteht. Dies konnte durch Experimente in dieser Arbeit nachgewiesen werden (Abb. 10). Im Vergleich zum Komplexmedium waren aber lediglich 5% der NO-Mengen im Minimalmedium detektierbar. Ein Wechsel des Mediums zur Vermeidung dieser chemischen Dekomposition scheint wenig erfolgversprechend, da bereits in Experimenten mit mehreren anderen Minimal- und Komplexmedien diese Reaktion

---

beobachtet wurde (Mania *et al.*, 2014; Nadeem *et al.*, 2012). Es sollte daher versucht werden, durch Kontrollexperimente die freigesetzten abiotischen NO-Mengen zu bestimmen, um diese dann bei den Ergebnissen der *W. succinogenes* Einzel- und Doppelmutanten berücksichtigen zu können. Wenn Kulturen der genannten Einzel- und Doppelmutanten selbst kein NO freisetzen, könnte externes NO zu den wachsenden Kulturen zugegeben werden. Erste Experimente in Zusammenarbeit mit D. Mania von der Norwegian University of Life Sciences zeigten, dass die externe Zugabe von 1000 nmol NO je Inkubationsgefäß von *W. succinogenes* Wildstamm, *W. succinogenes*  $\Delta$ nosZ und *W. succinogenes* komp<sub>P<sub>nos</sub></sub>nosZ innerhalb von 4 - 5 h zu N<sub>2</sub>O beziehungsweise zu N<sub>2</sub> reduziert wird. Die Zugabe dieser Menge an NO beeinträchtigte nicht das Wachstum der Zellen oder die Analyse der Gase in den Inkubationsgefäßen durch den Gaschromatographen (Luckmann *et al.*, in Vorbereitung).

Das mögliche Produkt der NO-Detoxifikation durch die eben genannten Proteine könnte N<sub>2</sub>O sein. Für gereinigtes Fdp-Protein aus *Thermotoga meritima* konnte dies bereits nachgewiesen werden (Hayashi *et al.*, 2010). Bislang galt der unvollständige Denitrifikationsprozess als Hauptquelle für die biotischen N<sub>2</sub>O-Emissionen.

## 5.2. Typische und atypische N<sub>2</sub>O-Reduktasen

Die Distickstoffmonoxid-Reduktase (N<sub>2</sub>OR) ist das einzige bekannte Enzym, welches N<sub>2</sub>O umsetzen kann. Dabei wird N<sub>2</sub> als alleiniges Produkt gebildet. Die N<sub>2</sub>O-Reduktase ist Bestandteil des Denitrifikationsprozesses und unterliegt in ihrer Aktivität speziellen Bedingungen wie beispielsweise den Nitrat-, den Nitrit- und/oder den Stickstoffmonoxid-Konzentrationen, dem pH-Wert und der Verfügbarkeit von Sauerstoff und Kupfer (Bergaust *et al.*, 2012; Felgate *et al.*, 2012; Kampschreur *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2010; Nadeem *et al.*, 2012; Richardson *et al.*, 2009; Woolfenden *et al.*, 2013). Die N<sub>2</sub>O-Reduktase wird durch das nosZ-Gen kodiert, welches in vielen denitrifizierenden Bakterien nachgewiesen werden konnte (Zumft & Kroneck, 2007). Distickstoffmonoxid ist ein klimarelevantes Gas, das maßgeblich zum anthropogenen Treibhauseffekt beiträgt (Bakken *et al.*, 2012; Lassey & Harvey, 2007; Richardson *et al.*, 2009; Thomson *et al.*, 2012). In zahlreichen Feldstudien diente das nosZ-Gen, welches mittels geeigneter Primer durch PCR amplifiziert werden kann, als Marker für N<sub>2</sub>O-reduzierende Gemeinschaften (Henderson *et al.*, 2010; Morales *et al.*, 2010; Wallenstein *et al.*, 2006). Basierend auf diesen Daten der Häufigkeit, der Verteilung und der anzunehmenden Expression des nosZ-Genes in den Proben wurde versucht, entsprechende N<sub>2</sub>O-Emissionen der Habitate vorauszusagen. Diskrepanzen zwischen den Voraussagen und den tatsächlich gemessenen Werten führten zu der Annahme, dass es einen weiteren bisher nicht berücksichtigten N<sub>2</sub>O-Umsatz geben muss. 2012 postulierte Sanford die Existenz von

---

„atypischen“ NosZ Proteinen als Grund für die Abweichungen in den Rechnungsmodellen (Sanford *et al.*, 2012). Die für diese Proteine kodierenden Gene ließen sich mit den bis dahin gebräuchlichen Primern nicht amplifizieren. Zu diesem Zeitpunkt war bereits bekannt, dass auch einige Nitrat-ammonifizierende Bakterien in der Lage sind N<sub>2</sub>O zu reduzieren (Payne *et al.*, 1982; Schumacher *et al.*, 1992; Teraguchi & Hollocher, 1989; Yoshinari, 1980). Die bioinformatische Analyse von Sanford deutet jedoch darauf hin, dass 41% der analysierten *nosZ*-Sequenzen als atypisch einzustufen sind. Als Grundlage dieses Vergleichsansatzes diente der gut charakterisierte Denitrifizierer *Bradyrhizobium japonicum*. Atypische *nosZ* weisen im Vergleich zu typischen *nosZ* enthaltenen Mikroorganismen eine größere Vielfalt in bakteriellen und archaealen Phyla auf und besitzen anstelle eines Tat-Signalpeptides am N<sub>2</sub>O-reduzierenden Enzym ein Sec-Signalpeptid (Tabelle 11; Jones *et al.*, 2013; Sanford *et al.*, 2012). Eine Ausnahme bildet dabei lediglich das Phylum *Chloroflexi*. Dieser kodiert für ein Tat-Signalpeptid, besitzt aber ansonsten alle Charakteristika einer atypischen N<sub>2</sub>O-Reduktase und wird deshalb auch als atypisch eingestuft. Durch das Tat vermittelte Transportsystem gelangen vollständig gefaltete Proteine mit ihrem entsprechendem Co-Faktor über die Membran. Im Gegensatz dazu werden im Sec vermittelten System ungefaltete Proteine transportiert. Durch den Austausch des Signalpeptides der atypischen N<sub>2</sub>O-Reduktase in *W. succinogenes* konnte weder das Enzym in der Hämfärbung noch das Apochytochrom mittels ELISA detektiert werden (Kapitel 4.4.1.; Abb. 24). Das verlangsamte Wachstum der Zellen von *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>*nosZ* Tat im Vergleich zu komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>*nosZ* lässt eine Behinderung des Tat vermittelten Transportsystems durch die modifizierte N<sub>2</sub>O Reduktase vermuten.

Ein weiterer Unterschied zwischen den typischen und atypischen N<sub>2</sub>O-Reduktase Proteinsequenzen zeigt sich in den konservierten Aminosäureresten, die das Cu<sub>2</sub>-Zentrum des Enzyms ligandieren. Zwei der sieben Bindemotive besitzen bei atypischen NosZ-Proteinen weniger konservierte Aminosäuren (DXHH, EPH) als dies für typische Proteine (DXHHXH, EPHD) gezeigt werden konnte (Tabelle 11; Kapitel 7.1. Alignment Nr. 3 grau markiert; Jones *et al.*, 2013). Auch bezüglich der Strukturen der entsprechenden *nos*-Gencluster konnten Unterschiede zwischen den beiden *nosZ*-Formen aufgezeigt werden. Das Fehlen der Gene *nosR* und *nosX* in den Genclustern ist charakteristisch für atypische *nosZ*. Dafür findet sich in jedem bisher analysierten *nos*-Gencluster, welches ein atypisches *nosZ*-Gen beinhaltet, ein für ein transmembranes Protein kodierendes Gen (*nosB*), das direkt stromabwärts des Gens der terminalen Reduktase lokalisiert ist (Abb. 39; Sanford *et al.*, 2012).

Tabelle 11: Unterschiedliche Charakteristika von typischen und atypischen N<sub>2</sub>O-Reduktasen

Merkmal	typische N <sub>2</sub> O-Reduktase	atypische N <sub>2</sub> O-Reduktase
Signalpeptid	Tat-Signalpeptid	Sec-Signalpeptid
Cu <sub>z</sub> -Bindemotiv	DXHHXH, EPHD	DXHH, EPH
Gene im <i>nos</i> -Gencluster	<i>nosR</i> , <i>nosX</i> vorhanden; <i>nosB</i> fehlt	<i>nosR</i> , <i>nosX</i> fehlen; <i>nosB</i> vorhanden
typische Vertreter	<i>Paracoccus denitrificans</i> , <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Wolinella succinogenes</i> , <i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>
Häm <i>c</i> -Domäne	nicht vorhanden	kann vorhanden sein

Eine Untergruppe der atypischen NosZ- bilden die cNosZ-Proteine, welche alle oben beschriebenen Merkmale einer atypischen Reduktase besitzen und zusätzlich eine Häm *c*-Bindedomäne am C-Terminus aufweisen. Ein cNosZ kodierendes Gen wird in den folgenden Abschnitten dieser Arbeit als *cnosZ* bezeichnet. Ein Vergleich aller in der NCBI Datenbank verfügbaren *nos*-Gencluster, welche ein cNosZ kodierendes Gen beinhalten, zeigt eine sehr hohe Ähnlichkeit in der Präsenz und Organisation der zugehörigen Gene (Abb. 39). Das putative – wahrscheinlich rudimentäre - Gencluster von *Campylobacter showae* CC57C kodiert nur für die Gene *cnosZ* und *nosB*. Als Basis für die Analyse der Proteine mittels des Programms BLAST wurden die abgeleiteten Aminosäuresequenzen aller Gene des *nos*-Genclusters aus *W. succinogenes* verwendet.

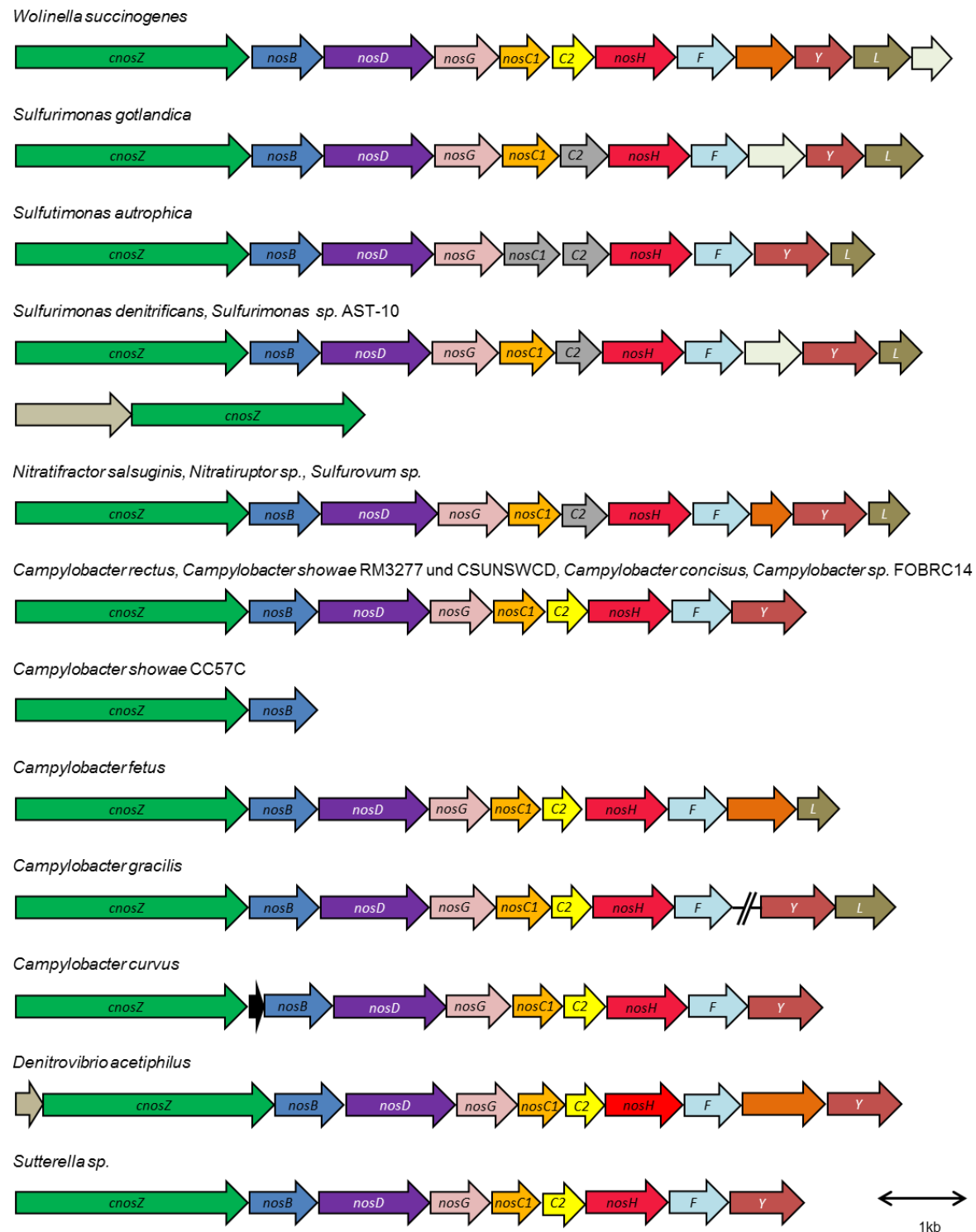


Abb. 39: Vergleich von 21 bekannten atypischen *nos*-Genclustern, welche für *cNosZ* kodieren. Als Referenz für die Analyse wurden die abgeleiteten Aminosäuresequenzen aller Gene des *nos*-Genclusters aus *W. succinogenes* verwendet. Bei einem Alignment Score unter 80 wurden die entsprechenden Gene grau hinterlegt. Bei nicht benannten Genen handelt es sich um hypothetische Gene. Bei *Sulfurimonas denitrificans*, *Sulfurimonas* sp. AST-10 und *Denitrovibrio acetiphilus* ist stromaufwärts von *cNosZ* ein Cytochrom-Gen lokalisiert (beige gekennzeichnet). *Campylobacter curvus* kodiert stromabwärts von *cNosZ* für ein kleines hypothetisches Gen (schwarz gekennzeichnet).

---

Die C-terminale Häm c-Bindedomäne wurde bislang als alleiniges Charakteristikum der cNosZ-Proteine von Epsilonproteobacteria angesehen (Jones *et al.*, 2013; Kern & Simon, 2008). Eine persönliche Analyse zeigt, dass aber auch Vertreter der Klassen Deferribacteres (*Denitrivibrio acetiphilus*) bzw. Beta-Proteobacteria (*Sutterella sp.*) dieses Merkmal kodieren (Abb. 39). Bemerkenswerterweise konnte in *Sulfurimonas denitrificans* und *Sulfurimonas sp.* AST-10 eine zusätzliche Kopie von *cnosZ* in einem zweiten Gencluster identifiziert werden, welches lediglich mit einem Monohäm Cytochrom *c<sub>553</sub>*-kodierenden Gen assoziiert ist (Abb. 39; Kern & Simon, 2008; Sievert *et al.*, 2008). Die derzeitig verfügbaren *nos*-Gencluster zeigen, dass stromabwärts von jedem cNosZ-kodierendem Gen (außer dem zweiten *cnosZ*-Gen in *Sulfurimonas*-Stämmen) immer ein weiteres Gen lokalisiert ist. Dieses wurde als *nosB* annotiert und kodiert möglicherweise für ein Protein, welches am Elektronentransfer beteiligt ist (van Spanning, 2011; siehe Kapitel 5.5.). Weitere Proteine, deren putative Beteiligung an der Kopplung des Elektronentransfers vom Menachinol zur Reduktase postuliert wurde, sind durch die Gene *nosG*, *nosH*, *nosC1* und *nosC2* in 18 der analysierten *nos*-Gencluster kodiert (Sanford *et al.*, 2012; Sievert *et al.*, 2008; Simon *et al.*, 2004; Spiro, 2012; Kapitel 5.5.). Die Analyse der Aminosäuresequenzen von NosC1 und NosC2 zeigt eine hohe Variabilität bezüglich des Alignment Scores auf. Dieser gibt die Ähnlichkeit der beiden verglichenen Sequenzen an. Identische Elemente werden hoch bewertet, stark unterschiedliche Elemente setzen den Score herab. Bei einem Alignment Score von unter 80 sind die entsprechenden Gene in Abb. 39 grau hinterlegt. Von den 20 analysierten *nos*-Genclustern betrifft dies ein *nosC1* Gen (*Sulfurimonas autrophica*) und sieben *nosC2* Gene. Die für akzessorische Proteine kodierenden Gene *nosD* und *nosF* lassen sich in allen Genclustern der untersuchten Organismen detektieren, *nosY* und *nosL* in den meisten (Abb. 39). Im Denitrifizierer *Pseudomonas stutzeri* bilden die Proteine NosD, NosF und NosY einen ABC-Transporter in der Membran, dem eine Funktion beim Zusammenbau des Cu<sub>Z</sub>-Zentrums von NosZ zugeordnet wird (Dooley *et al.*, 1991; Zumft, 2005). Für gereinigtes NosL aus dem denitrifizierendem Beta-Proteobakterium *Achromobacter cycloclastes* konnte eine spezifische und stöchiometrische Bindung von einem Atom Kupfer(I) pro NosL-Protein nachgewiesen werden (Dreusch *et al.*, 1996; McGuirl *et al.*, 2001; Taubner *et al.*, 2006). Eine Deletion des entsprechenden Gens führte jedoch nicht zu einem Verlust der Fähigkeit mit N<sub>2</sub>O als Elektronenakzeptor zu wachsen (Dreusch *et al.*, 1996). Über die Funktionen dieser Proteine im Reifungsprozess der cNosZ-Reduktase ist bisher nichts bekannt.

Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von cNosZ, welche aktuell (31.01.2014) in der NCBI Datenbank enthalten sind, deutet auf eine hohe Homogenität der cNosZ Proteine hin. Alle Sequenzen enthalten ein CXXCH Häm-Bindemotiv im C-terminalen Bereich (Kapitel



---

7.1. Alignment Nr. 3 grau markiert). Des Weiteren ist ein ungefähr 100 Aminosäuren umfassender Bereich zwischen der Domäne der N<sub>2</sub>O-Reduktase und der Cytochrom *c* Domäne lokalisiert, welcher als „Linker“ bezeichnet wird und für den transienten Kontakt der Cytochrom *c*-Domäne mit dem katalytischen Zentrum benötigt werden könnte (Dell’Acqua *et al.*, 2011b).

### 5.3. Wachstum von *W. succinogenes* durch N<sub>2</sub>O-Atmung

Die Funktionalität von gereinigtem atypischen NosZ konnte bereits für *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 und *Wolinella succinogenes* nachgewiesen werden (Liu *et al.*, 2008; Teraguchi & Hollocher, 1989). Während für *G. thermodenitrificans* die Produktion des Enzyms heterolog in *E. coli* erfolgte, konnte es aus *W. succinogenes* selbst isoliert werden. Dazu wurden Zellen von *W. succinogenes* anaerob bei 37 °C in einem Minimalmedium mit Zusatz von Hefeextrakt angezogen (VSY-Medium siehe Kapitel 3.2.1.). Als Elektronendonator fungierte Formiat; N<sub>2</sub>O war alleiniger Elektronenakzeptor (Teraguchi & Hollocher, 1989; Yoshinari, 1980). Unter diesen Zuchtbedingungen betrug die maximale optische Dichte 0,29 nach 18 h (OD<sub>660nm</sub>). Dies entspricht im Wesentlichen dem gleichen Biomassezuwachs wie mit Nitrat als Akzeptor im gleichen Basismedium. Auch wenn in Veröffentlichungen aus dem Arbeitskreis von Thomas C. Hollocher keine Aussagen zur erreichten optischen Dichte gemacht wurden, ist doch anzunehmen, dass diese auf Grund desselben Mediums vergleichbar waren. Aus diesen mit N<sub>2</sub>O gewachsenen Zellen wurde die N<sub>2</sub>O-Reduktase konventionell mittels Kationenaustauschchromatographie gereinigt (Teraguchi & Hollocher, 1989). Messungen mit reduziertem Benzylviologen als artifiziellen Elektronendonator und N<sub>2</sub>O als Substrat bestätigten die vermutete Funktion des Enzyms als N<sub>2</sub>O-Reduktase (spezifische Aktivität bei 25 °C und pH7,1: 160 μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>). Des Weiteren wurde die Fähigkeit der Oxidation von reduzierten Cytochromen *c* durch die Reduktase untersucht (Zhang & Hollocher, 1993). Aktivitätsmessungen mit Cytochrom *c* aus *W. succinogenes* (WS0700) wiesen dabei die schnellste Kinetik auf, im Vergleich zur Kinetik, die mit Cytochrom *c* aus Pferdeherz erhalten wurde. Während in Denitrifizierern die N<sub>2</sub>O-Reduktase in Gegenwart von Sauerstoff inaktiv ist, konnte für das cNosZ aus *W. succinogenes* keine Beeinträchtigung der Aktivität gezeigt werden (Zhang *et al.*, 1991). Lediglich nach einer 24-stündigen Lagerung des Enzyms bei Raumtemperatur in Gegenwart von Sauerstoff, war eine Verringerung von 10% messbar (Teraguchi & Hollocher, 1989).

Mit dem Medium, das von Yoshinari (1980) beschrieben wurde, konnten auch Payne und Kollegen Wachstum von *W. succinogenes* mit N<sub>2</sub>O als alleinigen Elektronenakzeptor nachweisen (Payne *et al.*, 1982). Die benötigte Inkubationszeit betrug jedoch mit 48 h mehr

---

als das Doppelte im Vergleich zu den Angaben von Hollocher bzw. Yoshinari. Aussagen zu erreichten optischen Dichten oder den erhaltenen Biomassen wurden von Payne *et al.* nicht gemacht. Selbiges trifft auf ein anderes Komplexmedium zu, welches für die Zucht von *W. succinogenes* mit N<sub>2</sub>O verwendet wurde (Schumacher *et al.*, 1992). Alle für die Forschung verwendeten *W. succinogenes* Zellen, sind auf das ursprüngliche Isolat von Wolin aus dem Jahr 1961 zurückzuführen (Wolin *et al.*, 1961). Kulturen von *W. succinogenes* wurden sowohl von Hanno Biebl in der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), als auch im amerikanischen Pendant, der American Type Culture Collection (ATCC), von Robert Smibert hinterlegt. Es ist sehr wahrscheinlich, dass seitdem genetische Variationen innerhalb der einzelnen Laborstämme aufgetreten sind. So besitzt der aktuell erhältliche Stamm von *W. succinogenes* bei der DSMZ eine natürliche Kanamycin-Resistenz, welche in dem in dieser Arbeit verwendeten Laborstamm fehlt (persönliche Mitteilung M. Kern). Im Arbeitskreis Kröger (Universität Frankfurt am Main) waren in den 1990er Jahren zwei Stämme von *W. succinogenes* vorhanden, die im Abstand von mehreren Jahren bei der DSMZ bestellt wurden. Ein Vergleich von Zellen beider Stämme bezüglich des Insertionselementes 1302 machte deutlich, dass es Unterschiede in der Platzierung von IS1302 im Genom gibt, nicht aber in der Anzahl der vorhandenen Kopien (Simon & Kröger, 1998). Für die Sequenzierung des Genoms durch Baar *et al.* 2003 wurden Zellen von *W. succinogenes* DSMZ 1740 kultiviert, die DNA isoliert und sequenziert. Das in der NCBI Datenbank hinterlegte Genom (NC\_005090.1) weist eine Unterbrechung von *cnosZ* durch das Insertionselement 1302 auf. Während dieser Arbeit wurden alle beschriebenen Experimente mit dem *W. succinogenes* Laborstamm (DSMZ 1740) des Arbeitskreises Simon durchgeführt. Mit diesem war weder ein Wachstum mit N<sub>2</sub>O als alleiniger Elektronenakzeptor zu detektieren noch eine vergleichbare N<sub>2</sub>O-Reduktaseaktivität zu messen, wie sie in der Literatur beschrieben ist. Eine Amplifikation des *cnosZ* Genes des Laborstammes mit spezifischen Primern, führte jedoch zu zwei unterschiedlich großen DNA-Fragmenten (Simon *et al.*, 2004). Das größere Fragment besitzt intern das IS1302, während dieses bei dem kleineren Fragment nicht vorhanden ist. Demnach gibt es Zellen, die keine Unterbrechung des *cnosZ*-Gens haben. Es ist denkbar, dass die von Yoshinari und später vom Arbeitskreis Hollocher verwendeten Zellen von *W. succinogenes* kein oder nur ein geringer Anteil der Zellen das Insertionselement im *cnosZ*-Gen besaßen und stets eine funktionelle Reduktase produzieren konnten. Die mehr als das Doppelte betragende Inkubationszeit für das Wachstum mit N<sub>2</sub>O bei Payne *et al.* (1982) könnte auf eine größere Heterogenität zwischen Zellen mit und ohne IS1302 im *cnosZ*-Gencluster zurückzuführen sein. Möglicherweise waren bereits Zellen mit einem Insertionselement vorhanden, wodurch nur ein gewisser Teil der Kultur das N<sub>2</sub>O verwerten

---

konnte und demnach zeitverzögert anwuchs. Dieser Annahme folgend, sollte theoretisch eine Selektion mit N<sub>2</sub>O auf Zellen ohne IS1302 auch mit dem im Arbeitskreis Simon verwendeten Laborstamm möglich sein. Ein Wachstum mit N<sub>2</sub>O als Akzeptor konnte jedoch auch nach mehrtägiger Inkubation nicht beobachtet werden. Eine mikroskopische Analyse zeigte keine lebenden Zellen mehr auf. Eine Überprüfung dieser Theorie der zunehmenden Anzahl an Zellen mit Insertionselement im *cnosZ*-Gen ist auf Grund der nicht vorhandenen genetischen Daten der Laborstämme von Yoshinari sowie aus den Arbeitskreisen Hollocher und Payne nicht möglich. Erste Daten diesbezüglich sind erst durch das sequenzierte Genom von Baar *et al.* verfügbar. Eine Sequenzierung des *nos*-Genclusters der in dieser Arbeit verwendeten Zellen des Laborstammes zeigte keine Veränderungen im Vergleich zur Genomsequenz von 2003 (Daten nicht gezeigt). Die Wiederherstellung des intakten *cnosZ* Genes durch genetische Manipulation (Abb. 6) führte zur Bildung einer funktionsfähigen N<sub>2</sub>O-Reduktase in *W. succinogenes* komp<sub>pnos</sub>*nosZ*, welche durch die Zugabe von 10% Acetylen inhibiert werden konnte (Abb. 11 untere Reihe, Abb. 18). Es wurde trotzdem kein Wachstum mit N<sub>2</sub>O als alleinigem Elektronenakzeptor detektiert.

#### 5.4. Vergleich der Gasprofile von *W. succinogenes* mit *P. denitrificans*

Das automatisierte Gas-Analyse-System ermöglichte nicht nur eine Untersuchung von *W. succinogenes* hinsichtlich der Produktion und des Verbrauches von gasförmigen Stickstoffverbindungen, sondern auch von *Paracoccus denitrificans*. Dieses Alpha-Proteobakterium besitzt alle nötigen Protein kodierenden Gene, um unter anaeroben Bedingungen Nitrat über die Intermediate Nitrit, Stickstoffmonoxid und Distickstoffmonoxid zu elementarem Stickstoff zu reduzieren (Abb. 2). *Paracoccus denitrificans* wird in den Arbeitskreisen Bakken und Frostegård (Norwegian University of Life Sciences) im sogenannten Sistrom-Medium vermehrt, welches 34 mM Succinat und 2 mM Nitrat enthält (Bergaust *et al.*, 2010). In wachsenden denitrifizierenden Kulturen von *P. denitrificans* akkumuliert mit maximal 20 nM nur eine geringfügige Menge an NO, im Vergleich zu den gemessenen Konzentrationen von 100-200 nM je Inkubationsgefäß in wachsenden ammonifizierenden Kulturen von *W. succinogenes* (Abb. 12 untere Reihe; Bakken *et al.*, 2012; Bergaust *et al.*, 2011). Eine vergleichbar hohe Konzentration mit 130 nM NO konnte bisher nur in Kulturen mit dem denitrifizierenden Bodenorganismus *Agrobacterium tumefaciens* detektiert werden (Bakken *et al.*, 2012; Bergaust *et al.*, 2008). Das NO wird durch *P. denitrificans* vollständig zu N<sub>2</sub> reduziert, wobei die Konzentration des Intermediates N<sub>2</sub>O während des Wachstums immer unter 2 µmol je Inkubationsgefäß lag (Bakken *et al.*, 2012; Bergaust *et al.*, 2011). Der Reduktionsprozess von Nitrat zu Stickstoff scheint im

---

Denitrifizierer *Paracoccus denitrificans* in einem Fließgleichgewicht zu sein. Die Produktion eines Produktes wie NO durch NirS ist vergleichbar mit dessen Reduktion durch das nachfolgende Enzym cNor (Abb. 2). Dadurch wird eine Akkumulation der Intermediate des Denitrifizierungsprozesses vermieden. In ammonifizierenden *W. succinogenes* Kulturen konnte in dieser Arbeit eine Akkumulation von Nitrit und NO detektiert werden (Abb. 12). Ein vergleichbares Fließgleichgewicht wie hier für *Paracoccus denitrificans* beschrieben, konnte nur für N<sub>2</sub>O in *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>nosZ Kulturen beobachtet werden. Das entstandene N<sub>2</sub>O wird umgehend zu N<sub>2</sub> reduziert und war während des Wachstums nicht nachweisbar (Abb. 12). In Kulturen von *W. succinogenes* Wildstamm und *W. succinogenes* ΔnosZ, welche kein funktionelles NosZ-Enzym kodieren, akkumuliert anstelle des N<sub>2</sub> eine korrespondierende Menge an N<sub>2</sub>O. Dennoch ist *W. succinogenes* kein Denitrifizierer, da der größte Teil an verfügbarem Nitrat in der Ammonifikation zu Ammonium umgesetzt wird. Die Produktion von N<sub>2</sub>O scheint eher ein Ergebnis der NO-Detoxifikation zu sein. Die Reduktion durch cNosZ dient vermutlich in erster Linie der Oxidation von Menachinol. In Formiat-reichen/Nitrat-limitiertem Medium (80 mM Formiat/10 mM Nitrat) und 1 % N<sub>2</sub>O wurde dieses reduziert, solange der Prozess der Ammonifikation andauerte. Nachdem alles verfügbare Nitrat und Nitrit umgesetzt war, wurde trotz des Vorhandenseins von Formiat das N<sub>2</sub>O nicht zu N<sub>2</sub> reduziert (Abb. 17).

### 5.5. Hypothetische Elektronentransferwege zu cNosZ in *W. succinogenes*

Die Reduktion von Menachinon in *W. succinogenes* ist an die Oxidation von Wasserstoff durch die Membran-ständige Nickel-Eisen-Hydrogenase oder an die Oxidation von Formiat durch die Membran-ständige Formiat-Dehydrogenase gekoppelt ist (Gross *et al.*, 2004; Kröger *et al.*, 2002; Unden *et al.*, 1982). Über Menachinol-oxidierende Proteine gelangen die Elektronen direkt oder über weitere periplasmatische Proteine zu katalytischen terminalen Reduktasen (Abb. 2, Abb. 5). Der Umfang der beteiligten Proteine an diesem Elektronentransfer kann sowohl zwischen Organismen, als auch zwischen den einzelnen Enzymen variieren (Simon & Klotz, 2013). So gelangen die für die Nitratreduktion benötigten Elektronen in *W. succinogenes* zunächst über den Membran-ständigen NapGH Komplex auf das lösliche NapB und von dort zur Reduktase NapA (Kern *et al.*, 2007; Kern & Simon, 2008). Im Gegensatz dazu sind an der Reduktion von Nitrit zu Ammonium nur die beiden Proteine NrfH und NrfA beteiligt. Das Membran-ständige NrfH nimmt die Elektronen vom Menachinol auf und leitet sie an die Cytochrom c Nitritreduktase NrfA weiter (Simon & Klotz, 2013). In *E. coli* werden die Elektronen vermutlich vom Chinol auf den Membran-ständigen Komplex NrfCD transferiert, der über das lösliche NrfB diese auf die terminale Reduktase NrfA weiterleitet

(Simon & Klotz, 2013). Zurzeit kann keine experimentell basierte Aussage über den funktionellen Elektronentransfer vom Menachinol zur atypischen  $\text{N}_2\text{O}$ -Reduktase mit einem zusätzlichen Cytochrom *c* am verlängerten C-Terminus getroffen werden. Durch die Sequenzierung des Genoms konnten jedoch Gene, die für putative Komponenten eines Transferweges kodieren, identifiziert werden. Mögliche Menachinol-Dehydrogenasen könnten die Proteine NosB sowie NosG und NosH sein, deren kodierende Gene im *nos*-Gencluster lokalisiert sind. Ebenso könnte der vom *nos*-Gencluster unabhängig durch *W. succinogenes* kodierte Cytochrom  $bc_1$ -Komplex beteiligt sein, dem eine Funktion in der mikroaeroben Atmung zugeschrieben wird. Als Mediator zwischen der Membran-gebundenen Chinol-Dehydrogenase und der terminalen  $\text{N}_2\text{O}$ -Reduktase wären ein oder mehrere lösliche Monohäm Cyochrome *c* (NosC1, NosC2, WS0700) denkbar. Alle hypothetischen Transferwege mit den daran beteiligten Komponenten vom Menachinol auf cNosZ in *W. succinogenes* sind in Abb. 40 zusammengefasst und werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

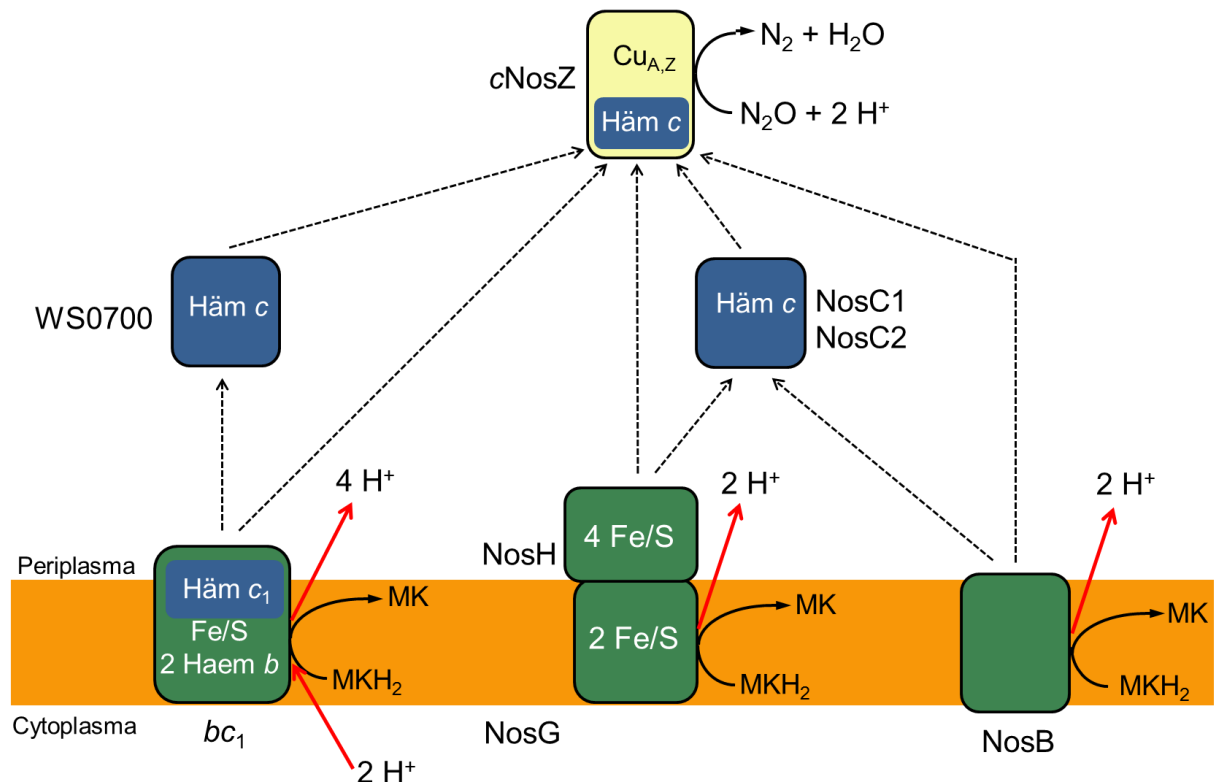


Abb. 40: Schematische Darstellung der hypothetischen Elektronentransferwege vom Menachinol ( $\text{MKH}_2$ ) zur terminalen  $\text{N}_2\text{O}$ -Reduktase in *W. succinogenes*. Mögliche Membran-gebundene Menachinol-Dehydrogenasen sind in grün dargestellt. Die schwarzen gestrichelten Pfeile markieren putative Elektronentransferwege von den Chinol-Dehydrogenasen zu cNosZ, die direkt oder über lösliche Monohäm Cyochrome *c* NosC1, NosC2 und WS0700 erfolgen könnten (in blau dargestellt). Die roten Pfeile markieren mögliche Protonentransferwege.

Die im *nos*-Gencluster identifizierten Gene *nosG* und *nosH* kodieren für eine NapGH-ähnliche Chinol-Dehydrogenase (Simon *et al.*, 2004). Für die Untersuchung der Funktionalität der

---

Proteine im Elektronentransferweg der Nitrat-Atmung wurden chimäre *nap/nos*-Gencluster in *W. succinogenes* konstruiert (Kern *et al.*, 2008). Hierfür wurden zunächst die Gene *nosG-H* im *nos*-Gencluster deletiert (*W. succinogenes*  $\Delta$ *nosG-H*). Des Weiteren wurde *napH* gegen *nosH* (*W. succinogenes* *napAG-nosH*  $\Delta$ *nosG-H*), *napG* gegen *nosG* (*W. succinogenes* *napA-nosG*  $\Delta$ *nosG-H*) oder *napGH* gegen *nosGH* (*W. succinogenes* *napA-nosGH*  $\Delta$ *nosG-H*) innerhalb des *nap*-Genclusters ausgetauscht. Eine Charakterisierung der oben genannten Mutanten erfolgte mittels Bestimmung der optischen Dichte nach Erreichen der stationären Phase in Nitrat-haltigem Medium. Als Referenz diente *W. succinogenes* Wildstamm. Die Deletion der Gene *nosG-H* führte zu keiner Beeinträchtigung des Wachstums in der Nitrat-Atmung im Vergleich zu *W. succinogenes* Wildstamm. Zellen des Stammes *W. succinogenes* *napAG-nosH*  $\Delta$ *nosG-H* bilden einen NosH/NapG-Komplex aus. Trotz einer verringerten optischen Dichte um 22% beim Wachstum im Vergleich zu *W. succinogenes* Wildstamm macht dieser Versuch deutlich, dass Elektronen vom Menachinol auf das Protein NosH übertragen werden (Kern & Simon, 2008). Die Zellen der chimären Konstrukte NapH/NosG und NosH/NosG erreichten nur 22 bzw. 4% der optischen Dichte im Wachstum im Vergleich zu *W. succinogenes* Wildstamm. Das Protein NosG scheint in den chimären Konstrukten nicht in der Lage zu sein, die erhaltenen Elektronen auf NapAB weiterzuleiten. Für den Elektronentransfer zur N<sub>2</sub>O-Reduktase ist davon auszugehen, dass NapG nicht als Elektronenmediator dient.

Das Membranprotein NosB, dessen kodierendes Gen immer stromabwärts von *cnosZ* lokalisiert ist, besitzt 4 vorhergesagte Transmembrane Helices (Abb. 39; Sanford *et al.*, 2012; van Spanning, 2011). Die konservierte Präsenz im *nos*-Gencluster atypischer *nosZ* und *cnosZ* kodierender Mikroorganismen macht eine Funktion in der N<sub>2</sub>O-Atmung wahrscheinlich. Möglicherweise fungiert es als Menachinol-Dehydrogenase. Van Spanning postulierte eine mögliche Bindung von einem Co-Faktor auf Grund eines konservierten Histidins und Methionins im Sequenzbereich NHXXGM (Kapitel 7.1. Alignment Nr. 1, türkis markiert).

Eine putative Beteiligung des Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplexes am Elektronentransfer wird ebenfalls diskutiert (Sanford *et al.*, 2012; van Spanning, 2011). In *Anaeromyxobacter dehalogenans* besteht das atypische *nos*-Gencluster aus 10 Leserahmen, in dem unter anderem für ein Rieske Eisen-Schwefel Protein, ein Cytochrome *b* und Cytochrom *c* kodierende Gene identifiziert wurden (Sanford *et al.*, 2012). Auch in anderen Organismen, die für ein atypisches *nosZ* kodieren, sind entsprechende Gene im *nos*-Gencluster lokalisiert, u. a. in *Desulfitobacterium dehalogenans*. In *W. succinogenes* befinden sich die entsprechenden Gene nicht im selben Gencluster wie *cnosZ*, sondern sind im Genom entfernt lokalisiert (WS2151, WS2152, WS2153). Eine mögliche Beteiligung am Elektronentransfer in der N<sub>2</sub>O-Atmung könnte durch die Zugabe von Myxothiazol untersucht werden. Dies ist ein spezifischer Inhibitor, welcher die

---

Elektronenweiterleitung innerhalb des *bc<sub>1</sub>*-Komplexes blockiert (Berry *et al.*, 2009; Deeudom *et al.*, 2006). In einer ammonifizierenden Kultur mit Zellen des Stammes *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>*nosZ*, welche N<sub>2</sub>O zu N<sub>2</sub> reduzieren (Abb. 12), könnte nach Zugabe des Inhibitors eine Akkumulation von N<sub>2</sub>O zu detektieren sein. Der erfolgreiche Einsatz von 1  $\mu$ M Myxothiazol an ganzen Zellen konnte bereits für *Neisseria meningitidis* nachgewiesen werden (Deeudom *et al.*, 2006). Eine während dieser Arbeit durchgeführte vorläufige Überprüfung des Wachstums von *W. succinogenes* Zellen in Fumarat-haltigem Medium mit Zusatz von 5, 10 und 15  $\mu$ M Myxothiazol zeigte keine Beeinträchtigung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle ohne Zugabe des Inhibitors (Daten nicht gezeigt).

1993 konnten Zhang und Hollocher bereits die Interaktion des gereinigten cNosZ-Proteins aus *W. succinogenes* mit drei verschiedenen Monohäm Cytochromen *c* nachweisen (Zhang & Hollocher, 1993). Diese wurden vor dem Enzymassay mit Dithionit reduziert. Die Abnahme der Extinktion bedingt durch die Oxidation des eingesetzten Cytochroms *c* durch die N<sub>2</sub>O-Reduktase wurde über einen Zeitraum von 90 Minuten photometrisch detektiert. Getestet wurde ein aus *W. succinogenes* isoliertes Protein (WS0700), welches nicht im *nos*-Gencluster kodiert ist, sowie ein aus Pferdeherz isoliertes Monohäm Cytochrom *c* und isoliertes Cytochrom *c*<sub>551</sub> aus *Pseudomonas aeruginosa*. Das Cytochrom *c* WS0700 wurde dabei am schnellsten im Enzymassay reoxidiert. Mit den beiden anderen Cytochromen *c* war ebenfalls eine N<sub>2</sub>O-Reduktaseaktivität messbar, jedoch mit geringeren Umsatzraten. In der Annahme, dass diese Interaktion auch unter physiologischen Bedingungen stattfindet, sind drei Monohäm Cytochrome *c* als Mediatoren im natürlichen System in *W. succinogenes* denkbar. Zum einen die Proteine NosC1 und NosC2, für welche im *nos*-Gencluster kodiert wird (WS0921 und WS0922), zum anderem das bereits *in vitro* getestete Protein WS0700.

Eine Deletion der Gene *nosG*, *nosC1*, *nosC2* und *nosH* in *W. succinogenes* hatte keinen Einfluss auf die Fumarat- und Nitratespiration (Kapitel 4.5.). Des Weiteren ist ein Unterschied in der Produktion beider Cytochrome *c* in der Hämfärbung zwischen *W. succinogenes*  $\Delta$ *nosG-H* und der Kontrolle *W. succinogenes* komp<sub>p<sub>nos</sub></sub>*nosZ*, welche über eine funktionsfähige N<sub>2</sub>O-Reduktase verfügt, nicht zu erkennen (Abb. 26). Eine mögliche Beteiligung der Monohäm Cytochrome *c* NosC1 und NosC2 am Elektronentransferweg vom putativen NosGH-Komplex oder vom transmembranen Protein NosB zur N<sub>2</sub>O-Reduktase kann dennoch nicht ausgeschlossen werden. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit versucht beide Proteine zu produzieren, sowohl homolog im *nos*- und *nrf*-Gencluster in *W. succinogenes* als auch heterolog in *E. coli* unter Verwendung von zwei verschiedenen Promotoren. Mittels des Programms I-Tasser (Roy *et al.*, 2012; Roy *et al.*, 2010; Zhang, 2008) wurden putative Strukturen beider Cytochrome

auf Basis bekannter Strukturen von Monohäm Cytochromen berechnet. Hierfür wurde die abgeleitete Aminosäuresequenz von *nosC1* und *nosC2* an das Programm übermittelt. Bekannte Strukturen und deren Sequenzen wurden als Ausgangspunkt für eine theoretische Tertiärstruktur von NosC1 und NosC2 verwendet. Sowohl für NosC1 als auch für NosC2 wurde die beste Übereinstimmung mit einem Cytochrom  $c_{552}$  aus *Acidithiobacillus ferrooxidans* ermittelt (Abergel *et al.*, 2003; PNO-Nummer 1H1O). Auf Grundlage der erhaltenen Daten wurde angenommen, dass sowohl der N- als auch der C-Terminus frei zugänglich sind und ein angefügter *Strep*-Tag bei einer Affinitätschromatographie folglich an die Säulenmatrix binden würde (Abb. 41). Die so gereinigten NosC Cytochrome *c* könnten in einem modifizierten Enzymassay nach Hollocher als Elektronenmediatoren eingesetzt werden (Zhang & Hollocher, 1993). Da vorherige Messungen mit Cytochrom *c* aus Pferdeherz als Mediator zu keiner messbaren  $N_2O$ -Reduktaseaktivität führten, sollten *W. succinogenes* eigene Cytochrome *c* zur Anwendung kommen.

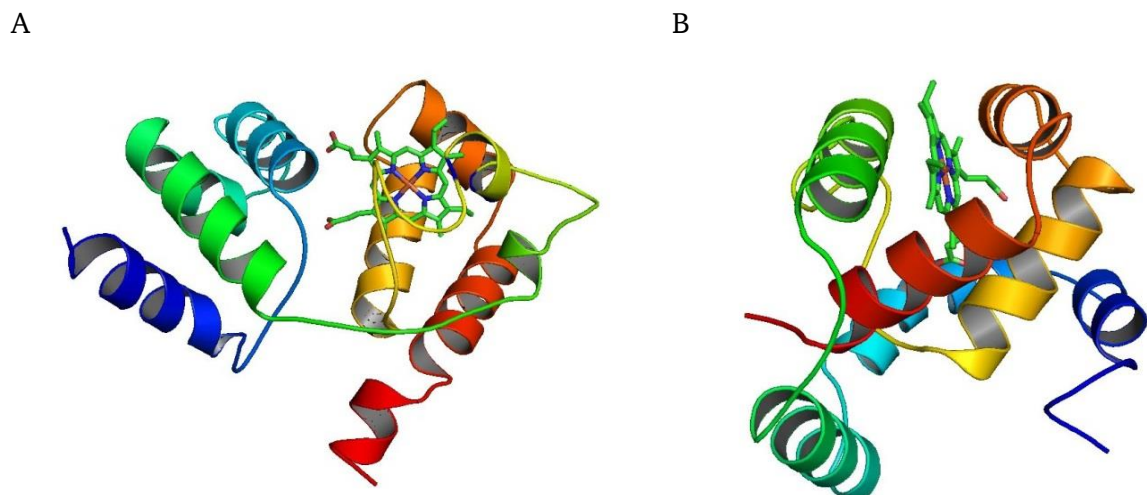


Abb. 41: Putative Struktur von NosC1 (A) und NosC2 (B), erhalten durch das Programm I-Tasser (Roy *et al.*, 2012; Roy *et al.*, 2010; Zhang, 2008) auf Basis der bekannten Kristallstruktur und Aminosäuresequenz von Cytochrom  $c_{552}$  aus *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Abergel *et al.*, 2003; PNO-Nummer 1H1O).

Es bleibt unklar, warum unter keiner der getesteten Bedingungen die Produktion von NosC1 und NosC2 gelang. Eine mögliche Erklärung für die fehlende homologe Produktion im *nos*-Gencluster (Kapitel 4.5.1.) wäre eine unzureichende oder abgebrochene Transkription der Leserahmen auf Grund des Insertionselementes (IS1302), welches bereits in *W. succinogenes* Wildstamm zu keiner Produktion von cNosZ führte. Erst in der genetisch stabilen Mutante *W. succinogenes* komp<sub>pnos</sub>*nosZ* war eine Detektion des cNosZ-Proteins in der Hämefärbung möglich (Abb.11 untere Reihe).



---

Die nicht gelungene homologe Produktion im *nrf*-Gencluster (Kapitel 4.5.2.) ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Proteine NosC1 und NosC2 selbst zurückzuführen. Dass sowohl die homologe als auch die heterologe Produktion von Multihäm Cytochromen *c* mit diesem System prinzipiell möglich ist, konnte bereits nachgewiesen werden (Kern & Simon, 2011). Die so produzierten Hydroxylamin-Reduktasen aus *Campylobacter fetus* (CFF8240\_0800) und *Campylobacter curvus* (CCV52592\_0434) wurden erfolgreich gereinigt (persönliche Mitteilung M. Kern). Eine Produktion der Reduktase aus *Kuenenia stuttgartiensis* (kustc 1061; kuste 2457) war hingegen nicht möglich. Warum einige rekombinante Cytochrome *c* Proteine in *W. succinogenes* im *nrf*-Gencluster produziert werden können und andere nicht, ist ungeklärt. Als alternatives Produktionssystem bietet sich das Gamma-Proteobakterium *Escherichia coli* an. Dieses verfügt über ein Cytochrom *c* Biogenese System, welches unter anoxischen Bedingungen aktiv ist. Von Nachteil ist dabei, dass unter anaeroben Wachstumsbedingungen sich die Zell- und folglich auch die Proteinausbeute bei *E. coli* deutlich vermindert. Eine aerobe Produktion von rekombinanten Cytochromen *c* wird durch das Plasmid pEC86 ermöglicht. Dieses kodiert für das *E. coli* eigene *ccm* Gencluster und wird konstitutiv exprimiert (Arslan *et al.*, 1998). Durch diesen Ansatz konnten Häm-haltige Proteine bereits erfolgreich produziert werden. Sowohl die Qualität als auch die Ausbeute kann dabei jedoch stark variieren (Hoffmann *et al.*, 2009; Kern & Simon, 2011). Zwar können Substanzen wie  $\delta$ -Aminolävulinat und der Einsatz von zusätzlichem Eisen unterstützend bei der Häm-Biosynthese wirken (Frick, 2009), führten aber bei Produktionsversuchen von NosC1 und NosC2 dennoch zu keiner Bildung der Holocytochrome (Kapitel 4.5.3.1.). Alternativ wurde versucht, die Monohäm Cytochrome *c* von *Denitrovibrio acetophilus* und *Sulfurimonas denitrificans* in *E. coli* zu produzieren. Beide Organismen kodieren ebenfalls für ein atypisches cNosZ und sind in der Organisation des *nos*-Genclusters mit *W. succinogenes* vergleichbar (Abb. 39). Ein Vergleich aller putativen NosC1 und NosC2 Sequenzen von Organismen mit einem atypischen *nosZ* zeigt eine höhere Ähnlichkeit aller NosC1-Sequenzen untereinander auf (Kapitel 7.1. Alignment Nr. 4). Dagegen sind die bekannten NosC2-Sequenzen weniger ähnlich zueinander (Kapitel 7.1. Alignment Nr. 5). Auf Grund dieser Ähnlichkeiten der NosC1-Proteine und der erfolgreichen Produktion des Apoproteins von NosC1 aus *W. succinogenes* in *E. coli* (Kapitel 4.5.3.1.; Abb. 31) wurde die heterologe Produktion von NosC1 forciert. Der Nachweis eines Holocytochroms konnte jedoch nicht erbracht werden (Kapitel 4.5.3.2.; Abb. 34).

---

## 6. Literaturverzeichnis

---

- Abergel, C., Nitschke, W., Malarte, G., Bruschi, M., Claverie, J. M., Giudici-Orticoni, M. T. (2003) The structure of *Acidithiobacillus ferrooxidans* c(4)-cytochrome: a model for complex-induced electron transfer tuning. *Structure* 11, 547-555
- Almeida, C. C., Romao, C. V., Lindley, P. F., Teixeira, M., Saraiva, L. M. (2006) The role of the hybrid cluster protein in oxidative stress defence. *J Biol Chem* 281, 32445-32450
- Arai, H., Mizutani, M., Igarashi, Y. (2002) Transcriptional regulation of the *nos* genes for nitrous oxide reductase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 149, 29-36
- Arkenberg, A., Runkel, S., Richardson, D. J., Rowley, G. (2011) The production and detoxification of a potent cytotoxin, nitric oxide, by pathogenic enteric bacteria. *Biochem Soc Trans* 39, 1876-1879
- Arslan, E., Schulz, H., Zufferey, R., Künzler, P., Thöny-Meyer, T. (1998) Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* c-type cytochrome subunits of the cbb3 oxidase in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Com* 251, 744-747
- Baar, C., Eppinger, M., Raddatz, G., Simon, J., Lanz, O., Klimmek, O., Nandakumar, R., Gross, R., Rosinus, A., Keller, H., Jagtap, P., Linke, B., Meyer, F., Lederer, H., Schuster, S.C. (2003) Complete genome sequence and analysis of *Wolinella succinogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 11690-11695
- Bakken, L. R., Bergaust, L., Liu, B., Frostegård, Å. (2012) Regulation of denitrification at the cellular level: a clue to the understanding of N<sub>2</sub>O emissions from soils. *Phil Trans R Soc B* 367, 1226–1234
- Bergaust, L., Mao, Y., Bakken, L. R., Frostegård, Å. (2010) Denitrification response patterns during the transition to anoxic respiration and posttranscriptional effects of suboptimal pH on nitrogen oxide reductase in *Paracoccus denitrificans*. *Appl Environ Microbiol* 76, 6387-6396
- Bergaust, L., van Spanning, R. J. M., Frostegård, Å., Bakken, L. R. (2012) Expression of nitrous oxide reductase in *Paracoccus denitrificans* is regulated by oxygen and nitric oxide through FnrP and NNR. *Microbiology* 158, 826-834
- Berry, E. A., Huang, L. S., Lee, D. W., Daldal, F., Nagai, K., Minagawa, N. (2009) Ascochlorin is a novel, specific inhibitor of the mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Biochim Biophys Acta* 1797, 360-370
- Bode, C., Goebell, H., Stähler, E. (1968) Zur Eliminierung von Trübungsfehlern bei der Eiweißbestimmung mit der Biuretmethode. *Zeitschrift für klinische Chemie und klinische Biochemie* 6, 418-422
- Bokranz, M., Katz, J., Schröder, I., Robertson, A. M., Kröger, A. (1983) Energy metabolism and biosynthesis of *Vibrio succinogenes* growing with nitrate or nitrite as terminal electron acceptor. *Arch Microbiol* 135, 36-41
- Bykov, D., Plog, M., Neese, F. (2014) Heme-bound nitroxyl, hydroxylamine, and ammonia ligands as intermediates in the reaction cycle of cytochrome c nitrite reductase: a theoretical study. *J Biol Inorg Chem* 19, 97-112.
- Canfield, D. E., Glazer, A. N., Falkowski, P. G. (2010) The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. *Science* 330, 192

- 
- Cartron, M. L., Roldán, M. D., Ferguson, S. J., Berks, B. C., Richardson, D. J. (2002) Identification of two domains and distal histidine ligands to the four haems in the bacterial c-type cytochrome NapC; the prototype connector between quinol/quinone and periplasmic oxido-reductases. *Biochem J* 368, 425-432.
- Costa, C., Macedo, A., Moura, I., Moura, J. J. G., Le Gall, J., Berlier, Y., Liu, M.-Y., Payne, W. J. (1990) Regulation of the hexaheme nitrite/nitric oxide reductase of *Desulfovibrio desulfuricans*, *Wolinella succinogenes* and *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 276, 67-70
- Corker, H., Poole, R. K. (2003) Nitric Oxide Formation by *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 278, 31584-31592
- Cuypers, H., Berghöfer, J., Zumft, W. G. (1995) Multiple *nosZ* promoters and anaerobic expression of *nos* genes necessary for *Pseudomonas stutzeri* nitrous oxide reductase and assembly of its copper centers. *Biochim Biophys Acta* 1264, 183-190
- Deeudom, M., Rock, J., Moir, J. (2006) Organization of the respiratory chain of *Neisseria meningitidis*. *Biochem Soc Trans* 34, 139-142
- Dell'Acqua, S., Pauleta, S. R., Moura, I., Moura, J. J. (2011a) The tetranuclear copper active site of nitrous oxide reductase: the Cu<sub>2</sub> center. *J Biol Inorg Chem* 16, 183-194
- Dell'Acqua, S., Moura, I., Moura, J.J.G., Pauleta, S.R. (2011b) The electron transfer complex between nitrous oxide reductase and its electron donors. *J Biol Inorg Chem* 16, 1241-1254
- Dell'Acqua, S., Pauleta, S. R., Moura, J. J., Moura, I. (2012) Biochemical characterization of the purple form of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* nitrous oxide reductase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367, 1204-1212
- Dooley, D. M., McGuirl, M. A., Rosenzweig, A. C., Landin, J. A., Scott, R., Zumft, W. G., Devlin, F., Stephens, P. J. (1991) Spectroscopic Studies of the Copper Sites in Wild-Type *Pseudomonas stutzeri* N<sub>2</sub>O Reductase and in an Inactive Protein Isolated from a Mutant Deficient in Copper-Site Biosynthesis. *Inorg Chem* 30, 3006-3011
- Dreusch, A., Riester, J., Kroneck P. M. H., Zumft, W. G. (1996) Mutation of the conserved Cys165 outside of the Cu<sub>A</sub> domain destabilizes nitrous oxide reductase but maintains its catalytic activity. *Biochem J* 237, 447-453
- Eichler, R. M. (2001) Charakterisierung von *Wolinella succinogenes* Nitrit-Reduktase-Mutanten. Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
- Einsle, O., Messerschmidt, A., Huber, R., Kroneck, P. M. H., Neese, F. (2002) Mechanism of the six-electron reduction of nitrite to ammonia by cytochrome c nitrite reductase. *J Am Chem Soc* 124, 11737-11745
- Ertem, M. Z., Cramer, C. J., Himo, F., Siegbahn, P. E. (2012) N-O bond cleavage mechanism(s) in nitrous oxide reductase. *J Biol Inorg Chem* 17, 687-698
- Figueiredo, M. C. O., Lobo, S. A. L., Sousa, S. H., Pereira, F. P., Wall, J. D., Nobre, L. S., Saraiva, L. M. (2013) Hybrid Cluster Proteins and Flavodiiron Proteins Afford Protection to *Desulfovibrio vulgaris* upon Macrophage Infection. *J Bacteriol* 195, 2684-2690

- 
- Felgate, H., Giannopoulos, G., Sullivan, M. J., Gates, A. J., Clarke, T. A., Baggs, E., Rowley, G., Richardson, D. J. (2012) The impact of copper, nitrate and carbon status on the emission of nitrous oxide by two species of bacteria with biochemically distinct denitrification pathways. *Environ Microbiol* 14, 1788–1800
- Fujita, K., Hirasawa-Fujita, M., Brown, D. E., Obara, Y., Ijima, F., Kohzuma, T., Dooley, D. M. (2012) Direct electron transfer from pseudoazurin to nitrous oxide reductase in catalytic N<sub>2</sub>O reduction. *J Inorg Biochem* 115, 163-173
- Francis, R. T., Becker, R. R. (1984) Specific indication of hemoproteins in polyacrylamide gels using a double-straining process. *Anal Biochem* 163, 509-514
- Frick, E. (2009) Rekombinante Produktion und Charakterisierung der c-Typ-Cytochrome NosC1 und NosC2 aus *Wolinella succinogenes*. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
- Gates, A. J., Luque-Almagro, V. M., Goddard, A. D., Ferguson, S. J., Roldán, M. D., Richardson, D. J. (2011) A composite biochemical system for bacterial nitrate and nitrite assimilation as exemplified by *Paracoccus denitrificans*. *Biochem J* 435, 743-753
- Gilberthorpe, N.J., Poole, R.K. (2008) Nitric oxide homeostasis in *Salmonella typhimurium*: roles of respiratory nitrate reductase and flavohemoglobin. *J Biol Chem* 283, 11146-11154
- Gross, R., Pisa, R., Sängler, M., Lancaster, C. R. D., Simon, J. (2004) Characterization of the menaquinone reduction site in the diheme cytochrome *b* membrane anchor of *Wolinella succinogenes* Ni/Fe-hydrogenase. *J Biol Chem* 279, 274-281
- Haltia, T., Brown, K., Tegoni, M., Cambillau, T., Saraste, N., Mattila, K., Djinic-Carugo, K. (2003) Crystal structure of nitrous oxide reductase from *Paracoccus denitrificans* at 1.6 Å resolution. *Biochem J* 369, 77-88
- Hartley, A. M., Asai, R. J. (1963) Spectrophotometric determination of nitrate with 2,6-xylenol reagent. *Anal Chem* 35, 1207-1213
- Hayashi, T., Caranto, J. D., Wampler, D. A., Kurtz Jr., D. M., Moënne-Loccoz, P. (2010) Insights into the nitric oxide reductase mechanism of flavodiiron proteins from a flavin-free enzyme. *Biochemistry* 49, 7040–7049
- Hedderich, R., Klimmek, O., Kröger, A., Dirmeier, R., Keller, M., Stetter, K. O. (1999) Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. *FEMS Microbiol Rev* 22, 353-381
- Henderson, S. L., Dandie, C. E., Patten, C. L., Zebarth, B. J., Burton, D. L., Trevors, J. T., Goyer, C. (2010) Changes in Denitrifier Abundance, Denitrification Gene mRNA Levels, Nitrous Oxide Emissions, and Denitrification in Anoxic Soil Microcosms Amended with Glucose and Plant Residues. *Appl Environ Microbiol* 76, 2155–2164
- Hoffmann, M., Seidel, J., Einsel, O. (2009) CcpA from *Geobacter sulfurreducens* Is a Basic Di-Heme Cytochrome *c* Peroxidase. *J Mol Biol* 393, 951-965
- Honisch, U., Zumft, W. G. (2003) Operon structure and regulation of the *nos* gene region of *Pseudomonas stutzeri*, encoding an ABC-Type ATPase for maturation of nitrous oxide reductase. *J Bacteriol* 186, 1895-1902

---

Hoehne, E. (Diplomarbeit 2008) Entwicklung eines mechanistischen Modells zur Simulation der frostbedingten N<sub>2</sub>O Emission aus Böden. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

IPCC (2007) Climate change 2007: synthesis report. Contribution of working groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core writing team, Pachauri, R.K., and Reisinger, A. (eds)]. IPCC, Geneva, Switzerland

Jones, C.M., Graf, D.R.H., Bru, D., Philippot, L., Hallin, S. (2013) The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink. ISME J 7, 417-426

Justino, M.C., Ecobichon, C., Fernandes, A.F., Boneca, I.G., Saraiva, L.M. (2012) *Helicobacter pylori* has an unprecedented nitric oxide detoxifying system. Antioxid Redox Sign 17, 1190-1200

Kampschreur, M. J., Kleerebezem, R., Picioreanu, C., Bakken, L. R., Bergaust, L., deVries, S., Jetten, M. S. M., van Loosdrecht, M. C. M. (2012) Metabolic modeling of denitrification in *Agrobacterium tumefaciens*: a tool to study inhibiting and activating compounds for the denitrification pathway. Front. Microbiol. 3, 370

Kern, M., Mager A. M., Simon, J. (2007) Role of individual *nap* gene cluster products in NapC-independent nitrate respiration of *Wolinella succinogenes*. Microbiology 153, 3739-3747

Kern, M., Simon, J. (2008) Characterization of the NapGH quinol dehydrogenase complex involved in *Wolinella succinogenes* nitrate respiration. Mol Microbiol 69, 1137-1152

Kern, M., Simon, J. (2009) Electron transport chains and bioenergetics of respiratory nitrogen metabolism in *Wolinella succinogenes* and other Epsilonproteobacteria. Biochim Biophys Acta 1787, 646-656

Kern, M., Eisel, F., Scheithauer, J., Kranz, R.G., Simon, J. (2010) Substrate specificity of three cytochrome *c* haem lyase isoenzymes from *Wolinella succinogenes*: unconventional haem *c* binding motifs are not sufficient for haem *c* attachment by Nrfl and CcsA1. Mol Microbiol 75, 122-137

Kern, M., Simon, J. (2011) Production of recombinant multiheme cytochrome *c* in *Wolinella succinogenes*. Meth Enzymol 486, 429-446

Kern, M., Klotz, M. G., Simon, J. (2011) The *Wolinella succinogenes* *mcc* gene cluster encodes an unconventional respiratory sulphite reduction system. Mol Microbiol 82, 1515-1530

Kern, M., Volz, J., Simon, J. (2011) The oxidative stress defence network of *Wolinella succinogenes*: cytochrome *c* nitrite reductase mediates the stress response to nitrite, nitric oxide, hydroxylamine and hydrogen peroxide. Environ Microbiol 13, 2478-2494

Kiss, H., Lang, E., Lapidus, A., Copeland, A., Nolan, M., Glavina Del Rio, T., Chen, F., Lucas, S., Tice, H., Cheng, J. F., Han, C., Goodwin, L., Pitluck, S., Liolios, K., Pati, A., Ivanova, N., Mavromatis, K., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Chang, Y. J., Jeffries, C. D., Detter, J. C., Brettin, T., Spring, S., Rohde, M., Göker, M., Woyke, T., Bristow, J., Eisen, J. A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N. C., Klenk, H. P. (2010) Complete genome sequence of *Denitrovibrio acetiphilus* type strain (N2460). Stand Genomic Sci 2, 270-279

Kröger, A., Biel, S., Simon, J., Gross, R., Unden, G., Lancaster, C. R. D. (2002) Fumarate respiration of *Wolinella succinogenes*: enzymology, energetics and coupling mechanism. Biochim Biophys Acta 1553, 23-38

- 
- Lassey, K., Harvey, M. (2007) Nitrous oxide: the serious side of laughing gas. *Water & Atmosphere* 15
- Lämmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Liu, X., Gao, C., Zhang, A., Jin, P., Wang, L., Feng, L. (2008) The *nos* gene cluster from gram-positive bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 and functional characterization of the recombinant NosZ. *FEMS Microbiol Lett* 289, 46-52
- Liu, B., Mørkved, P.T., Frostegård, Å., Bakken, L.R. (2010) Denitrification gene pools, transcription and kinetics of NO, N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> production as affected by soil pH. *FEMS Microbiol Ecol* 72, 407-417
- Lorenzen J.P., Kröger A., Unden G. (1993) Regulation of anaerobic respiratory pathways in *Wolinella succinogenes* by the presence of electron acceptors. *Arch Microbiol* 159, 477-483
- Mania, D., Heylen, K., van Spanning, R. J. M., Frostegård, Å. (2014) The nitrate-ammonifying and *nosZ* carrying bacterium *Bacillus vireti* is a potent source and sink for nitric and nitrous oxides under high nitrate conditions (Manuskript eingereicht)
- McGuirl, M. A., Bollinger, J. A., Cosper, N., Scott, R. A., Dooley, D. M. (2001) Expression, purification, and characterization of NosL, a novel Cu(I) protein of the nitrous oxide reductase (*nos*) gene cluster. *J Biol Inorg Chem* 6, 189-195
- Miroux, B., Walker, J. E. (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* 260, 289-298
- Molstad, L., Dörsch, P., Bakken, L.R. (2007) Robotized incubation system for monitoring gases (O<sub>2</sub>, NO, N<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>) in denitrifying cultures. *J Microbiol Meth* 71, 202-211
- Morales, S. E., Cosart, T., Holben W. E. (2010) Bacterial gene abundances as indicators of greenhouse gas emission in soils. *ISME J* 4, 799-808
- Nadeem, S., Dörsch, P., Bakken, L. R. (2012) The significance of early accumulation of nanomolar concentrations of NO as an inducer of denitrification. *FEMS Microbiol Ecol* 83, 672-684
- Payne, W.J., Grant, M.A., Shapleigh, J., Hoffman, P. (1982) Nitrogen oxide reduction in *Wolinella succinogenes* and *Campylobacter* species. *J Bacteriol* 152, 915-918
- Pfennig, N., Trüper, H.G. (1981) Isolation of members of the families Chromatiaceae and Chlorobiaceae. In *The Prokaryotes*, pp. 279-289. Edited by M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balous, H.G. Schlegel. New York, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag
- Poock, S. R., Leach, E. R., Moir, J. W., Cole, J. A., Richardson, D. J. (2002) Respiratory detoxification of nitric oxide by the cytochrome c nitrite reductase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 277, 23664-23669
- Pomowski, A., Zumft, W. G., Kroneck, P.M.H., Einsle, O. (2011) N<sub>2</sub>O binding at a [4Cu:2S] copper-sulphur cluster in nitrous oxide reductase. *Nature* 477, 234-237
- Ravishankara, A. R., Daniel, J. S., Portmann, R. W. (2009) Nitrous Oxide (N<sub>2</sub>O): The dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science* 326, 123-125

- 
- Richardson, D. J., Felgate, H., Watmough, N., Thomson, A., Baggs, E. (2009) Mitigating release of the potent greenhouse gas N<sub>2</sub>O from the nitrogen cycle – could enzymic regulation hold the key? *Trends Biotechnol* 27, 388-397
- Rider, B. F., Mellon, M. G. (1946) Colorimetric determination of nitrite. *Indust Engin Chem* 18, 96-98
- Rodrigues, R., Vicente, J. B., Felix, R., Oliveira, S., Teixeira, M., Rodrigues-Pousada, C. (2006) *Desulfovibrio gigas* flavodiiron protein affords protection against nitrosative stress in vivo. *J Bacteriol* 188, 2745-2751
- Rowley, G., Henson, D., Felgate, H., Arkenberg A., Appia-Ayme, C., Prior, K., Harrington, C., Field, S. J., Butt, J. N., Baggs, E., Richardson D. J. (2012) Resolving the contributions of the membrane-bound and periplasmic nitrate reductase systems to nitric oxide and nitrous oxide production in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Biochem J* 441, 755-762
- Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y. (2010) I-Tasser: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Prot* 5, 725-738
- Roy, A., Yang, J., Zhang, Y. (2012) COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucleic Acids Research* 40, Web Server issue W471–W477
- Ruser, R., Flessa, H., Schilling, R., Beese, F., Munch, J. C. (2001) Effect of crop-specific field management and N-fertilization on N<sub>2</sub>O emission from fine-loamy soil. *Nutr Cycl Agroecosys* 59: 177-191
- Sanford, R. A., Wagner, D. D., Wu, Q., Chee-Sanford, J. C., Thomas, S. H., Cruz-Garcia, C., Rodriguez, G., Massel-Deyá, A., Krishnani, K. K., Ritalahti, K. M., Nissen, S., Konstantinidis, K. T., Löffler, F. E. (2012) Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 19709-19714
- Saraiva, L. M., Vicente, J. B., Teixeira, M. (2004) The role of the flavodiiron proteins in microbial nitric oxide detoxification. *Adv Microb Physiol* 49, 77-129
- Saunders, N. F., Houben, E. N., Koefoed, S., de Weert, S., Reijnders, W. N., Westerhoff, H. V., De Boer, A. P., Van Spanning, R. J. (1999) Transcription regulation of the nir gene cluster encoding nitrite reductase of *Paracoccus denitrificans* involves NNR and NirI, a novel type of membrane protein. *Mol Microbiol* 34, 24-36
- Saunders, N. F., W., Hornberg, J. J., Reijnders, W. N. M., Westerhoff, H. V., De Vries, S., Van Spanning, R. J. M. (2000) The NosX And NirX Proteins Of *Paracoccus Denitrificans* Are Functional Homologues: Their Role In Maturation Of Nitrous Oxide Reductase. *J Bacteriol* 182, 5211–5217
- Schumacher, W., Kroneck, P. M. H., Pfennig, N. (1992) Comparative systematic study on “Spirillum” 5175, *Campylobacter* and *Wolinella* species. *Arch Microbiol* 158, 287-293
- Sievert, S. M., Scott, K. M., Klotz, M. G., Chain, P. S. G., Hauser, L. J., Hemp, J., Hügler, M., Land, M., Lapidus, A., Larimer, F. W., Lucas, S., Malfatti, S. A., Meyer, F., Paulsen, I. T., Ren, Q., Simon, J., the USF Genomics Class (2008) Genome of the Epsilonproteobacterial Chemolithoautotroph *Sulfurimonas denitrificans*. *Appl Environ Microbiol* 74, 1145-1156
- Simon, J., Kröger, A. (1998) Identification and characterization of IS1302, a novel insertion element from *Wolinella succinogenes* belonging to the IS3 family. *Arch Microbiol* 170, 43-49

- 
- Simon, J., Gross, R., Einsle, O., Kroneck, P. M., Kröger, A., Klimmek, O. (2000) A NapC/NirT-type cytochrome *c* (NrfH) is the mediator between the quinone pool and the cytochrome *c* nitrite reductase of *Wolinella succinogenes*: Mol Microbiol 35, 686-696
- Simon, J. (2002) Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. FEMS Microbiol Rev 26, 285-309
- Simon, J., Sängler, M., Schuster, S. C., Gross, R. (2003) Electron transport to peroplasmic nitrate reductase (NapA) of *Wolinella succinogenes* is independent of a NapC protein. Mol Microbiol 49, 69-79
- Simon, J., Einsle, O., Kroneck, P. M. H., Zumft, W. G. (2004) The unprecedented *nos* gene cluster of *Wolinella succinogenes* encodes a novel respiratory electron transfer pathway to cytochrome *c* nitrous oxide reductase. FEBS Lett 569, 7-12
- Simon, J., Hederstedt, L. (2011) Composition and function of cytochrome *c* biogenesis System II. FEBS J 278, 4179–4188
- Simon, J., Kern, M., Hermann, B., Einsle, O., Butt, J. N. (2011) Physiological function and catalytic versatility of bacterial multihaem cytochromes *c* involved in nitrogen and sulfur cycling. Biochem Soc Trans 39, 1864-1870
- Simon, J., Klotz, M. G. (2013) Diversity and evolution of bioenergetic systems involved in microbial nitrogen compound transformations. Biochim Biophys Acta 1827, 114-135
- Skerra, A. (1994) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. Gene 151, 131-135
- Snyder, S. W., Hollocher, T. C. (1986) Purification and some characteristics of nitrous oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. J Biol Chem 262, 6515-6525
- Spiro, S. (2012) Nitrous oxide production and consumption: regulation of gene expression by gas-sensitive transcription factors. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 367, 1213-1225
- Stach, P., Einsle, O., Schumacher, W., Kurun, E., Kroneck, P. M. (2000) Bacterial cytochrome *c* nitrite reductase: new structural and functional aspects. J Inorg Biochem 79, 381-385.
- Stehfest, E., Bouwman, L. (2006) N<sub>2</sub>O and NO emission from agricultural fields and soils under natural vegetation: summarizing available measurement data and modeling of global annual emissions. Nutr Cycl Agroecosys 74, 207-228
- Sullivan, M. J., Gates, A. J., Appia-Ayme, C., Rowley, G., Richardson, D. J. (2013) Copper control of bacterial nitrous oxide emission and its impact on vitamin B<sub>12</sub>-dependent metabolism. Proc Natl Acad Sci USA 110, 19926-19931
- Taubner, L. M., McGuirl, M. A., Dooley, D. M., Copie, V. (2006) Structural Studies of Apo NosI, an Accessory Protein of the Nitrous Oxide Reductase System: Insights from Structural Homology with MerB, a Mercury Resistance Protein. Biochemistry 45, 12240-12252
- Teraguchi, S., Hollocher, T.C. (1989) Purification and some characteristics of a cytochrome *c*-containing nitrous oxide reductase from *Wolinella succinogenes*. J Biol Chem 264, 1972-1979



- 
- Thomson, A. J., Giannopoulos, G., Pretty, J., Baggs, E. M., Richardson, D. J. (2012) Biological sources and sinks of nitrous oxide and strategies to mitigate emissions. *Phil Trans R Soc B* 367, 1157-1168
- Uden, G., Böcher, R., Knecht, J., Kräger, A. (1982) Hydrogenase from *Vibrio succinogenes*, a nickel protein. *FEBS Lett* 145, 230-234
- van Spanning, R.J.M. (2011) Structure, function, regulation and evolution of the nitrite and nitrous oxide reductases: denitrification enzymes with a beta-propeller fold. In *Nitrogen Cycling in Bacteria*, pp. 135-161. Edited by J.W.B. Moir. Norfolk, UK: Caister Academic Press
- Velasco, L., Mesa, S., Xu, C., Delgado, A., Bedmar, E. J. (2004) Molecular characterization of *nosRZDFYLX* genes coding for denitrifying nitrous oxide reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Antonie van Leeuwenhoek* 85, 229-235
- Vollack, K.-U., Zumft, W. G. (2001) Nitric oxide signaling and transcriptional control of denitrification genes in *Pseudomonas stutzeri*. *J Bacteriol* 183, 2516-2526
- Wallenstein, M. D., Myrold, D. D., Firestone, M., Voytek, M. (2006) environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. *ecol Applicat* 16, 2143-2152
- Watmough, N. J., Field, S. J., Hughes, R. J., Richardson, D. J. (2009) The bacterial respiratory nitric oxide reductase. *Biochem Soc Trans* 37, 392-399
- Wolin, M. J., Wolin, E. A., Jacobs, N. J. (1961) Cytochrome-producing anaerobic vibrio, *Vibrio succinogenes* sp. n.. *J Bacteriol* 81, 911-917
- Woelfenden, H. C., Gates, A. J., Bocking, C., Blyth, M. G., Richardson, D. J., Moulton, V. (2013) Modeling the effect of copper availability on bacterial denitrification. *Microbiologyopen* 2, 756-765
- Wunsch, P., Zumft, W. G. (2005) Functional Domains of NosR, a Novel Transmembrane Iron-Sulfur Flavoprotein Necessary for Nitrous Oxide Respiration. *J Bacteriol* 187, 1992-2001
- Wunsch, P., Körner, H., Neese, F., van Spanning, R. J. M., Kroneck, P. M. H., Zumft, W. G. (2005) NosX function connects to nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) reduction by affecting the Cu<sub>2</sub> center of NosZ and its activity in vivo. *FEBS Lett* 579, 4605-4609
- Wüst, A., Schneider, L., Pomowski, A., Zumft, W.G., Kroneck, P. M. H., Einsle, O. (2012) Nature's way of handling a greenhouse gas: the copper-sulfur cluster of purple nitrous oxide reductase. *Biol Chem* 393, 1067-1077
- Yoshinari, T. (1980) N<sub>2</sub>O reduction by *Vibrio succinogenes*. *Appl Environ Microbiol* 39, 81-84
- Zeidler, S. (2012) Untersuchungen zur N<sub>2</sub>O-Atmung in *Paracoccus denitrificans* und *Wolinella succinogenes*. Technische Universität Darmstadt
- Zhang, C., Hollocher, T. C., Kolodziej, A. F., Orme-Johnson, W. H. (1991) Electron paramagnetic resonance observations on the cytochrome c-containing nitrous oxide reductase from *Wolinella succinogenes*. *J Biol Chem* 266, 2199-2202
- Zhang, C., Hollocher, T. C. (1993) The reaction of reduced cytochromes c with nitrous oxide reductase of *Wolinella succinogenes*. *Biochim Biophys Acta* 1142, 253-261

---

Zhang, Y. (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC Bioinformatic 9, 40

Zumft, W. G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol Mol Biol Rev 61, 533-616

Zumft, W. G. (2005) Biogenesis of the Bacterial Respiratory Cu<sub>A</sub>, Cu-S Enzyme Nitrous Oxide Reductase. J Mol Microbiol Biotechnol 10, 154-166

Zumft, W.G., Viebrock-Sambale, A., Braun, C. (1990) Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. Eur J Biochem 192, 591-599

Zumft, W.G., Kroneck, P. M. H. (2007) Respiratory transformation of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) to dinitrogen by *Bacteria* and *Archaea*. Adv Microb Physiol 52, 107-227

## 7. Anhang

### 7.1. Alignments

transmembrane Helix		transmembrane Helix	
<i>W. succinogenes</i>	1	menrgiakyki	1
<i>S. gotlandica</i>	1	---alpsvvyplmt	1
<i>S. autotrophica</i>	1	---faskvwnlnkrykys	1
<i>S. denitrificans</i>	1	---fskvtwnlnkrykys	1
<i>S. sp. AST-10</i>	1	---fskvtwnlnkrykys	1
<i>N. saluginis</i>	1	---fskvtwnlnkrykys	1
<i>Nitratiruptor sp</i>	1	---fskvtwnlnkrykys	1
<i>Sulfurovum sp.</i>	1	---fskvtwnlnkrykys	1
<i>C. rectus RM3267</i>	1	---fskvtwnlnkrykys	1
<i>C. showae RM3277</i>	1	---fskvtwnlnkrykys	1
<i>C. showae CSUNSW</i>	1	---fskvtwnlnkrykys	1
<i>C. concisus 1382</i>	1	---fskvtwnlnkrykys	1
<i>C. concisus UNSW</i>	1	---fskvtwnlnkrykys	1
<i>C. sp. FOBR014</i>	1	---fskvtwnlnkrykys	1
<i>C. fetus</i>	1	---fskvtwnlnkrykys	1
<i>C. gracilis</i>	1	---fskvtwnlnkrykys	1
<i>C. curvus 525_92</i>	1	---fskvtwnlnkrykys	1
<i>D. acetiphilus</i>	1	---fskvtwnlnkrykys	1
<i>Sutterella sp.</i>	1	---fskvtwnlnkrykys	1
<i>W. succinogenes</i>	111	vyfhdvsgdvhemnt	111
<i>S. gotlandica</i>	112	vyfhdvsgdvhemnt	112
<i>S. autotrophica</i>	112	vyfhdvsgdvhemnt	112
<i>S. denitrificans</i>	112	vyfhdvsgdvhemnt	112
<i>S. sp. AST-10</i>	112	vyfhdvsgdvhemnt	112
<i>N. saluginis</i>	112	vyfhdvsgdvhemnt	112
<i>Nitratiruptor sp</i>	113	vyfhdvsgdvhemnt	113
<i>Sulfurovum sp.</i>	106	vyfhdvsgdvhemnt	106
<i>C. rectus RM3267</i>	106	vyfhdvsgdvhemnt	106
<i>C. showae RM3277</i>	106	vyfhdvsgdvhemnt	106
<i>C. showae CSUNSW</i>	106	vyfhdvsgdvhemnt	106
<i>C. concisus 1382</i>	106	vyfhdvsgdvhemnt	106
<i>C. concisus UNSW</i>	106	vyfhdvsgdvhemnt	106
<i>C. sp. FOBR014</i>	106	vyfhdvsgdvhemnt	106
<i>C. fetus</i>	106	vyfhdvsgdvhemnt	106
<i>C. gracilis</i>	106	vyfhdvsgdvhemnt	106
<i>C. curvus 525_92</i>	111	lyvhdfsgdvhemnt	111
<i>D. acetiphilus</i>	106	vyfhdvsgdvhemnt	106
<i>Sutterella sp.</i>	80	wfhdvsgdvhemnt	80

	transmembrane Helix
<i>W. succinogenes</i>	231 fgfwvmvmsalslalfskrqlrqnapeak--
<i>S. gotlandica</i>	232 igfymivaigllslaffakqkalkemqg---
<i>S. autotrophica</i>	232 igfymillslslaffakqkalkemkk---
<i>S. denitrificans</i>	232 igfylvivaigllslaffakqkalkemng---
<i>S. sp. AST-10</i>	232 igfymvlglfslaffakqkalkemqg---
<i>N. salisuginis</i>	232 igfwllalafslaiivskrrrlagqtv---
<i>Nitratiruptor sp</i>	233 igfwllaisftlailsknrylkerkvs---
<i>Sulfurovum sp.</i>	231 igfwllvaisvlsilalaaakrygkseqaa---
<i>C. rectus RM3267</i>	226 igfwmmamsalcilavfkkkkelk---eak---
<i>C. showae RM3277</i>	226 igfwmmamsalcilavfkkkkelk---dak---
<i>C. showae CSUNSW</i>	226 igfwmmamsalcilavfkkkkelk---dak---
<i>C. concisus 1382</i>	226 igfwmmvmvslcilavfkkkkeln---a---
<i>C. concisus UNSW</i>	226 igfwmmvmvslcilavfkkkkeln---a---
<i>C. sp. FOBC14</i>	226 igfwmmamsalcilavfkkkkelk---g---
<i>C. showae CC57C</i>	226 igfwmmamsalcilavfkkkkelk---dak---
<i>C. fetus</i>	226 igfwmmamsifcilaifskkkylk---skads
<i>C. gracilis</i>	231 igfwlmlslslsalallskkkflrehr-----
<i>C. curvus 525.92</i>	226 igfwmmamsalcilavfkkkkelk---g---
<i>D. acetiphilus</i>	231 igfwllvisalsilailsrnes-----
<i>Sutterella sp.</i>	200 igfwllviavlsilailarhkalsepqa-----

Alignment Nr. 1: Sequenzvergleich von NosB-Proteinen, welcher mit dem Programm Clone Manager 9 erstellt und manuell bearbeitet wurde. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt. Die Zahlen am Anfang jeder Zeile zeigen die Aminosäuresequenz-Nummerierung. Identische Aminosäuren sind rot hinterlegt. Die gekennzeichneten putativen transmembranen Helices wurden mit dem Programm TMHMM Server v. 2.0 bestimmt. Die durch das Programm TMHMM Server v. 2.0 bestimmte wahrscheinliche Orientierung ist folgendermaßen gekennzeichnet; o: periplasmatisch orientiert; i: cytoplasmatisch orientiert; Eine mögliche Bindungsstelle eines Co-Faktors ist der konservierte Sequenzbereich NHXXGM, welcher Türkis markiert ist

WS1903	1	---	m	k	a	l	a	l	f	s	g	g	l	s	l	s	m	k	l	i	q	e	m	g	i	e	v	a	l	h	f	n	i	g	f	a	n	r	d	k	l	e	y	l	q	n	a	t	a	q	i	g	v	e	l	r	v	l	d	i	q	e	f	f	n	e	v	l	f	n	p	v	h	y	g	y	k	y	f	n	p	c	i	d						
HP0013	1	m	k	k	i	k	a	l	a	l	f	s	g	g	l	s	l	s	m	k	l	i	d	q	i	e	v	t	a	l	h	f	n	i	g	f	g	n	k	d	k	r	e	y	f	e	n	a	t	a	q	i	g	a	k	l	v	c	d	i	r	e	q	f	f	n	d	v	l	f	k	p	k	y	g	y	k	y	f	n	p	c	i	d						
WS1903	88	c	h	a	n	m	f	r	h	a	r	l	r	l	e	g	e	a	s	f	i	i	s	g	e	v	i	g	g	r	p	k	s	q	r	r	e	a	l	h	q	v	e	n	l	t	q	t	k	g	-----	l	i	r	p	l	s	a	k	l	p	p	t	l	a																									
HP0013	91	c	h	a	n	m	f	r	n	a	f	y	k	m	i	e	l	n	a	d	f	v	i	s	g	e	v	l	g	g	r	p	k	s	q	r	k	e	a	l	n	q	v	r	k	l	v	r	e	v	g	e	e	a	r	f	d	p	v	l	d	r	t	q	a	g	g	k	p	q	f	i	d	e	l	l	r	p	m	s	a	k	l	l	e	p	t	f	m	
WS1903	154	e	e	r	g	w	v	d	r	e	k	l	l	d	i	h	g	r	g	r	d	r	q	l	a	m	a	k	s	y	g	w	v	y	f	e	k	p	g	g	g	c	l	l	t	d	s	h	v	a	l	k	l	k	d	i	t	q	r	r	k	p	v	m	e	d	i	a	l	v	k	n	g	r	y	l	i	l	p	e	g	a	r	l	v	i	s	r	n	q
HP0013	181	e	k	k	f	v	d	r	e	k	l	l	d	v	s	g	r	g	r	s	r	g	l	q	m	i	k	d	y	g	l	k	y	e	k	p	g	g	g	c	l	l	t	d	i	q	v	s	n	k	i	n	l	k	e	y	r	e	m	v	f	e	d	s	v	i	v	k	n	g	r	y	f	v	l	p	h	n	a	r	l	v	v	a	r	n	e			
WS1903	244	e	n	r	k	l	e	r	p	h	p	l	m	d	f	i	n	p	k	d	w	v	g	p	i	a	l	l	d	k	e	a	s	l	p	d	r	a	l	a	g	s	l	t	l	a	y	g	k	h	e	p	n	q	e	y	e	v	m	i	g	k	e	r	l	t	l	r	p	f	p	s	k	s	e	a	q	r	f	i	l	g	i	a	q	d	l	p	k	n
HP0013	271	e	n	h	k	i	d	i	q	h	p	l	m	d	k	i	e	l	l	n	c	k	p	l	s	l	v	d	k	n	a	s	k	e	d	k	e	l	a	g	r	i	a	l	g	y	a	k	t	l	k	n	d	a	y	l	i	q	i	g	d	e	k	r	e	l	y	p	l	-	d	k	e	n	a	r	e	y	l	f	a	-----								

Alignment Nr. 2: Sequenzvergleich von NorH-Proteinen aus *Helicobacter pylori* (HP0013) und *Wolinella succinogenes* (WS1903), welcher mit dem Programm Clone Manager 9 erstellt und manuell bearbeitet wurde. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt. Die Zahlen am Anfang jeder Zeile zeigen die Aminosäuresequenz-Nummerierung. Identische Aminosäuren sind rot hinterlegt.

<i>W. succinogenes</i>	1 -mqrlkq-----slvvtasli-lalg--ta-----slass-diqtimkeksltekdlvlaaakypsggrkdefvssggsgsqiliyygvpsnrikykigvftpepqwgygfddskkylrqgdiigreinwdthhpnte
<i>S. gotlandica</i>	1 -mtkhfnklt---slvlgttl-vatv--as-----aaggg-eiekmkanglndviraakynptggrdefiivssggsgsqvilygvpsnriikyavfpepqwgygyvdsikilyrqnigreinwdthhpalse
<i>S. autotrophica</i>	1 -matnrisrl-----tslllgts-laata--ma-----saang-eiekmkanglndviraakynptggrdefiivssggsgsqvilygvpsnriikyavfpepqwgygydeeskkilyrqnigreinwdthhpalse
<i>S. denitrificans</i>	1 ---mtkh-----skilvslil-vgas--vavsvasad-eiekmkanglndviraakynptggrdefiivssaggagqvilygvpsnriikyavfpepqwgygfdeeskkilyrqnigreinwdthhpalse
<i>S. denitrificans</i>	1 -mkkylqi-----vygallgv-lviv--qs-----ataes-eiekmkanglndviraakynptggrdefiivssggsgsqvilygvpsnriikyavfpepqwgygfdeeskkilyrqnigreinwdthhpalse
<i>S. sp. AST-10</i>	1 -mtkhfki-----asvllggt-laata--va-----saasgveiekmkanglndviraakynptggrdefiivssaggagqvilygvpsnriikyavfpepqwgygfdeeskkilyrqnigreinwdthhpalse
<i>S. sp. AST-10</i>	1 -mkrylqt-----tssvvlgt-fimt--gt-----lvags-erfkmmkgltekdlvlaaakynptggrdefiivssaggagqvilygvpsnriikyavfpepqwgygfdeeskkilyrqnigreinwdthhpalse
<i>N. salisuginis</i>	1 -mnmvnlr-----sllaagal-vgvs--mv-----sadhns-eiekmkanglndviraakynptggrdefiivssggsgsqvilygvpsnriikyavfpepqwgygfdeeskkilyrqnigreinwdthhpalse
<i>Nitratiruptor sp.</i>	1 -myrmkr-----lislvaaga-glvs--tv-----slaag-eiekmkanglndviraakynptggrdefiivssggsgsqvilygvpsnriikyavfpepqwgygfdeeskkilyrqnigreinwdthhpalse
<i>Sulfurovum sp.</i>	1 -msyklskl-----tsllfgsa-lsvs--tl-----fgas-aiekmkanglndviraakynptggrdefiivssggsgsqvilygvpsnriikyavfpepqwgygfdeeskkilyrqnigreinwdthhpalse
<i>C. rectus RW3267</i>	1 -mnnllsc-----givaaslafavs--ga-----casgs-diqaimkanglndviraakynptggrdefiivssggsgsqvilygvpsnriikyavfpepqwgygydeeskkilyksaigkqitwdthhpalte
<i>C. showae CSUNSW</i>	1 -mnnllsc-----givaagaiafavs--sa-----caads-diqaimkanglndviraakynptggrdefiivssggsgsqvilygvpsnriikyavfpepqwgygydeeskkilyksaigkqitwdthhpalte
<i>C. showae CSUNSW</i>	1 -mnnllsc-----givaagaiafavs--sa-----caads-diqaimkanglndviraakynptggrdefiivssggsgsqvilygvpsnriikyavfpepqwgygydeeskkilyksaigkqitwdthhpalte
<i>C. concisus UNSW</i>	1 -mqklf-----cvasaal-lglsltaa-----caass-diekmkanglndviraakynptggrdefiivssggsgsqvilygvpsnriikyavfpepqwgygydeskavlkqgnigkeiwdthhpalte
<i>C. concisus 1382</i>	1 -mqklf-----cvasaal-lglsltaa-----caass-diekmkanglndviraakynptggrdefiivssggsgsqvilygvpsnriikyavfpepqwgygydeskavlkqgnigkeiwdthhpalte
<i>C. FOBRCl4</i>	1 -mqkfl-n-----scia gial-lglslf-sa-----acsas-diekmkanglndviraakynptggrdefiivssggsgsqvilygvpsnriikyavfpepqwgygydeskavlkqgnigkeiwdthhpalte
<i>C. showae CC57C</i>	1 -mnnllsc-----givaagaiafavs--sa-----catds-diqaimkanglndviraakynptggrdefiivssggsgsqvilygvpsnriikyavfpepqwgygydeeskkilyksaigkqitwdthhpalte
<i>C. fetus</i>	1 -mnsfikt-----pvltagi-clsl--ss-----vfgas-eietimkenlsekdlilaakypsggrkdefiivssggsgsqvilygvpsnriikyavfpepqwgygydeskavlkqgnigkeiwdthhpalte
<i>C. gracilis</i>	1 -mksfkt-----vllgsv-l-faas--al-----caads-diermkenlsekdlilaakypsggrkdefiivssggsgsqvilygvpsnriikyavfpepqwgygydeskavlrsgingkeiwdthhpalte
<i>C. curvus 252.92</i>	1 -mqkfl-n-----scia gial-lglslf-sa-----acsas-diekmkanglndviraakynptggrdefiivssggsgsqvilygvpsnriikyavfpepqwgygydeskavlkqgnigkeiwdthhpalte
<i>D. acetiphilus</i>	1 -mskv--r-----nvlllflsl-fvfv--tg-----asast--lqdimkqnlsekdlilaakypsggrkdefiivssggsgsqvilygvpsnriikyavfpepqwgygydeskavlkqgnigkeiwdthhpalte
<i>Sutterella sp.</i>	1 ---mklkqwkvlipisvass-lcl-----c-----diass-dieaimkenlsekdlilaakypsggrdeymvssggsgsqvilygvpsnriikyavfpepqwgygydeskavlagkiiirgdiwdthhpalte
<i>W. succinogenes</i>	128 kngeyvgdylfndkanprlavnlhdfttdqivvnpimksehggsvtbpnteivyiasqyaaplndhqnypieeyavrgavlwmkfydskgldkdekasfslfppymqdladagkesfgwaftsnfsemytggiel
<i>S. gotlandica</i>	130 kdkgydgrwlaindkanprlavnlhdfttdqivvnpimksehggsvtbpnteivyiasqyaaplndhqnypieeyavrgavlwmkfydskgldkdekasfslfppymqdladagkesfgwaftsnfsemytggiel
<i>S. autotrophica</i>	129 tngrydgtkwa indkanprlavnlhdfttdqivvnpimksehggsvtbpnteivyiasqyaaplndhqnypieeyavrgavlwmkfydskgldkdekasfslfppymqdladagkesfgwaftsnfsemytggiel
<i>S. denitrificans</i>	128 kdkgydgrwla indkanprlavnlhdfttdqivvnpimksehggsvtbpnteivyiasqyaaplndhqnypieeyavrgavlwmkfydskgldkdekasfslfppymqdladagkesfgwaftsnfsemytggiel
<i>S. denitrificans</i>	128 sdgkydgykylfndkanprlavnlhdfttdqivvnpimksehggsvtbpnteivyiasqyaaplndhqnypieeyavrgavlwmkfydskgldkdekasfslfppymqdladagkesfgwaftsnfsemytggiel
<i>S. sp. AST-10</i>	130 kdkgydgrwla indkanprlavnlhdfttdqivvnpimksehggsvtbpnteivyiasqyaaplndhqnypieeyavrgavlwmkfydskgldkdekasfslfppymqdladagkesfgwaftsnfsemytggiel
<i>S. sp. AST-10</i>	128 tdkgydghllfndkanprlavnlhdfttdqivvnpimksehggsvtbpnteivyiasqyaaplndhqnypieeyavrgavlwmkfydskgldkdekasfslfppymqdladagkesfgwaftsnfsemytggiel
<i>N. salisuginis</i>	129 tngrydgtkwa indkanprlavnlhdfttdqivvnpimksehggsvtbpnteivyiasqyaaplndhqnypieeyavrgavlwmkfydskgldkdekasfslfppymqdladagkesfgwaftsnfsemytggiel
<i>Nitratiruptor sp.</i>	128 tngrydgtkwa indkanprlavnlhdfttdqivvnpimksehggsvtbpnteivyiasqyaaplndhqnypieeyavrgavlwmkfydskgldkdekasfslfppymqdladagkesfgwaftsnfsemytggiel
<i>Sulfurovum sp.</i>	128 tngrydgtkwa indkanprlavnlhdfttdqivvnpimksehggsvtbpnteivyiasqyaaplndhqnypieeyavrgavlwmkfydskgldkdekasfslfppymqdladagkesfgwaftsnfsemytggiel
<i>C. rectus RW3267</i>	129 kngeyvgdylfndkanprlavnlhdfttdqivvnpimksehggsvtbpnteivyiasqyaaplndhqnypieeyavrgavlwmkfydskgldkdekasfslfppymqdladagkesfgwaftsnfsemytggiel
<i>C. showae RW3277</i>	129 kngeyvgdylfndkanprlavnlhdfttdqivvnpimksehggsvtbpnteivyiasqyaaplndhqnypieeyavrgavlwmkfydskgldkdekasfslfppymqdladagkesfgwaftsnfsemytggiel
<i>C. showae CSUNSW</i>	129 kngeyvgdylfndkanprlavnlhdfttdqivvnpimksehggsvtbpnteivyiasqyaaplndhqnypieeyavrgavlwmkfydskgldkdekasfslfppymqdladagkesfgwaftsnfsemytggiel
<i>C. concisus UNSW</i>	127 kngeyvgdylfndkanprlavnlhdfttdqivvnpimksehggsvtbpnteivyiasqyaaplndhqnypieeyavrgavlwmkfydskgldkdekasfslfppymqdladagkesfgwaftsnfsemytggiel
<i>C. concisus 1382</i>	127 kngeyvgdylfndkanprlavnlhdfttdqivvnpimksehggsvtbpnteivyiasqyaaplndhqnypieeyavrgavlwmkfydskgldkdekasfslfppymqdladagkesfgwaftsnfsemytggiel
<i>C. FOBRCl4</i>	128 kngeyvgdylfndkanprlavnlhdfttdqivvnpimksehggsvtbpnteivyiasqyaaplndhqnypieeyavrgavlwmkfydskgldkdekasfslfppymqdladagkesfgwaftsnfsemytggiel
<i>C. fetus</i>	128 kngeyvgdylfndkanprlavnlhdfttdqivvnpimksehggsvtbpnteivyiasqyaaplndhqnypieeyavrgavlwmkfydskgldkdekasfslfppymqdladagkesfgwaftsnfsemytggiel
<i>C. gracilis</i>	127 kngeyvgdylfndkanprlavnlhdfttdqivvnpimksehggsvtbpnteivyiasqyaaplndhqnypieeyavrgavlwmkfydskgldkdekasfslfppymqdladagkesfgwaftsnfsemytggiel
<i>C. curvus 252.92</i>	128 kngeyvgdylfndkanprlavnlhdfttdqivvnpimksehggsvtbpnteivyiasqyaaplndhqnypieeyavrgavlwmkfydskgldkdekasfslfppymqdladagkesfgwaftsnfsemytggiel
<i>D. acetiphilus</i>	125 kngeyvgdylfndkanprlavnlhdfttdqivvnpimksehggsvtbpnteivyiasqyaaplndhqnypieeyavrgavlwmkfydskgldkdekasfslfppymqdladagkesfgwaftsnfsemytggiel
<i>Sutterella sp.</i>	129 ngeytdgylfndkanprlavnlhdfttdqivvnpimksehggsvtbpnteivyiasqyaaplndhqnypieeyavrgavlwmkfydskgldkdekasfslfppymqdladagkesfgwaftsnfsemytggiel



<i>W. succinogenes</i>	268	glppfeagmsrndaflhvyvnywqleklagdpknykiyghrvhrviseaavkagalflilpepksphgvavspdgryivvvgkldthasvydfkrlkqildkkefagdpypgipildmktlhbqvgelgplhhtyda---
<i>S. gotlandica</i>	270	gmppneagmsrndaflhvyvnywqleklakdknvkiinghkvipievavkndalflilpepksphgvavspdgryivvvgkldthasvykwsdkeliisktygkdpypgipildmksllhgqvgelgplhhtyda---
<i>S. autotrophica</i>	269	gmppfeagmsrndaflhvyvnywqleklakdknvkiinghkvipievavkndalflilpepksphgvavspdgryivvvgkldthasvykwsdkeliisktygkdpypgipildmksllhgqvgelgplhhtyda---
<i>S. denitrificans</i>	268	gmppneagmsrndaflhvyvnywqleklakdknvkiinghkvipievavkndalflilpepksphgvavspdgryivvvgkldthasvykwsdkeliisktygkdpypgipildmksllhgqvgelgplhhtyda---
<i>S. denitrificans</i>	268	glppfeagmsrndaflhvyvnywqleklakdknvkiinghkvipievavkndalflilpepksphgvavspdgryivvvgkldthasvykwsdkeliisktygkdpypgipildmksllhgqvgelgplhhtyda---
<i>S. sp. AST-10</i>	270	gmppneagmsrndaflhvyvnywqleklakdknvkiinghkvipievavkndalflilpepksphgvavspdgryivvvgkldthasvykwsdkeliisktygkdpypgipildmksllhgqvgelgplhhtyda---
<i>S. sp. AST-10</i>	268	gmppneagmsrndaflhvyvnywqleklakdknvkiinghkvipievavkndalflilpepksphgvavspdgryivvvgkldthasvykwsdkeliisktygkdpypgipildmksllhgqvgelgplhhtyda---
<i>N. salusuginis</i>	269	glppfeagmsrndaflhvyvnywqleklakdknvkiinghkvipievavkndalflilpepksphgvavspdgryivvvgkldthasvykwsdkeliisktygkdpypgipildmksllhgqvgelgplhhtyda---
<i>Nitratiruptor sp</i>	268	glppfeagmsrndaflhvyvnywqleklakdknvkiinghkvipievavkndalflilpepksphgvavspdgryivvvgkldthasvykwsdkeliisktygkdpypgipildmksllhgqvgelgplhhtyda---
<i>Sulfurovum sp.</i>	268	glppfeagmsrndaflhvyvnywqleklakdknvkiinghkvipievavkndalflilpepksphgvavspdgryivvvgkldthasvykwsdkeliisktygkdpypgipildmksllhgqvgelgplhhtyda---
<i>C. rectus RW3267</i>	269	glppfeagmsrndaflhvyvnywqleklakdknvkiinghkvipievavkndalflilpepksphgvavspdgryivvvgkldthasvykwsdkeliisktygkdpypgipildmksllhgqvgelgplhhtyda---
<i>C. showae CSUNSW</i>	269	glppfeagmsrndaflhvyvnywqleklakdknvkiinghkvipievavkndalflilpepksphgvavspdgryivvvgkldthasvykwsdkeliisktygkdpypgipildmksllhgqvgelgplhhtyda---
<i>C. showae CSUNSW</i>	269	glppfeagmsrndaflhvyvnywqleklakdknvkiinghkvipievavkndalflilpepksphgvavspdgryivvvgkldthasvykwsdkeliisktygkdpypgipildmksllhgqvgelgplhhtyda---
<i>C. concisus UNSW</i>	267	glppfeagmsrndaflhvyvnywqleklakdknvkiinghkvipievavkndalflilpepksphgvavspdgryivvvgkldthasvykwsdkeliisktygkdpypgipildmksllhgqvgelgplhhtyda---
<i>C. concisus 1382</i>	267	glppfeagmsrndaflhvyvnywqleklakdknvkiinghkvipievavkndalflilpepksphgvavspdgryivvvgkldthasvykwsdkeliisktygkdpypgipildmksllhgqvgelgplhhtyda---
<i>C. FOBRCl4</i>	268	glppfeagmsrndaflhvyvnywqleklakdknvkiinghkvipievavkndalflilpepksphgvavspdgryivvvgkldthasvykwsdkeliisktygkdpypgipildmksllhgqvgelgplhhtyda---
<i>C. showae CC57C</i>	269	glppfeagmsrndaflhvyvnywqleklakdknvkiinghkvipievavkndalflilpepksphgvavspdgryivvvgkldthasvykwsdkeliisktygkdpypgipildmksllhgqvgelgplhhtyda---
<i>C. fetus</i>	268	glppfeagmsrndaflhvyvnywqleklakdknvkiinghkvipievavkndalflilpepksphgvavspdgryivvvgkldthasvykwsdkeliisktygkdpypgipildmksllhgqvgelgplhhtyda---
<i>C. gracilis</i>	267	glppneagmsrndaflhvyvnywqleklakdknvkiinghkvipievavkndalflilpepksphgvavspdgryivvvgkldthasvykwsdkeliisktygkdpypgipildmksllhgqvgelgplhhtyda---
<i>C. curvus 252.92</i>	268	glppfeagmsrndaflhvyvnywqleklakdknvkiinghkvipievavkndalflilpepksphgvavspdgryivvvgkldthasvykwsdkeliisktygkdpypgipildmksllhgqvgelgplhhtyda---
<i>D. acetiphilus</i>	265	gmppneagmsrndaflhvyvnywqleklakdknvkiinghkvipievavkndalflilpepksphgvavspdgryivvvgkldthasvykwsdkeliisktygkdpypgipildmksllhgqvgelgplhhtyda---
<i>Sutterella sp.</i>	269	gmppneagmsrndaflhvyvnywqleklakdknvkiinghkvipievavkndalflilpepksphgvavspdgryivvvgkldthasvykwsdkeliisktygkdpypgipildmksllhgqvgelgplhhtyda---
<i>W. succinogenes</i>	405	q----dgiitytslyvdsqivkdyknkvlrdtrnvnyighidsmegksakpgkyaaladklisdrfnvpplhpqnhqldidgppkmellydpliplegphdvvisaadklkpqvtpmgtnsrtgkqheamtlagder
<i>S. gotlandica</i>	407	v----dgeiitytslyvdsqivkdyknkvlrdtrnvnyighidsmegksakpgkyaaladklisdrfnvpplhpqnhqldidgppkmellydpliplegphdvvisaadklkpqvtpmgtnsrtgkqheamtlagder
<i>S. autotrophica</i>	408	k----dgeiitytslyvdsqivkdyknkvlrdtrnvnyighidsmegksakpgkyaaladklisdrfnvpplhpqnhqldidgppkmellydpliplegphdvvisaadklkpqvtpmgtnsrtgkqheamtlagder
<i>S. denitrificans</i>	405	l----dgeiitytslyvdsqivkdyknkvlrdtrnvnyighidsmegksakpgkyaaladklisdrfnvpplhpqnhqldidgppkmellydpliplegphdvvisaadklkpqvtpmgtnsrtgkqheamtlagder
<i>S. denitrificans</i>	405	e----dgtiitytslyvdsqivkdyknkvlrdtrnvnyighidsmegksakpgkyaaladklisdrfnvpplhpqnhqldidgppkmellydpliplegphdvvisaadklkpqvtpmgtnsrtgkqheamtlagder
<i>S. sp. AST-10</i>	407	v----dgeiitytslyvdsqivkdyknkvlrdtrnvnyighidsmegksakpgkyaaladklisdrfnvpplhpqnhqldidgppkmellydpliplegphdvvisaadklkpqvtpmgtnsrtgkqheamtlagder
<i>S. sp. AST-10</i>	405	e----dgiivsslyvdsqivkdyknkvlrdtrnvnyighidsmegksakpgkyaaladklisdrfnvpplhpqnhqldidgppkmellydpliplegphdvvisaadklkpqvtpmgtnsrtgkqheamtlagder
<i>N. salusuginis</i>	409	k----dgeiitytslyvdsqivkdyknkvlrdtrnvnyighidsmegksakpgkyaaladklisdrfnvpplhpqnhqldidgppkmellydpliplegphdvvisaadklkpqvtpmgtnsrtgkqheamtlagder
<i>Nitratiruptor sp</i>	405	kwktegeiitytslyvdsqivkdyknkvlrdtrnvnyighidsmegksakpgkyaaladklisdrfnvpplhpqnhqldidgppkmellydpliplegphdvvisaadklkpqvtpmgtnsrtgkqheamtlagder
<i>Sulfurovum sp.</i>	407	k----dgeiitytslyvdsqivkdyknkvlrdtrnvnyighidsmegksakpgkyaaladklisdrfnvpplhpqnhqldidgppkmellydpliplegphdvvisaadklkpqvtpmgtnsrtgkqheamtlagder
<i>C. rectus RW3267</i>	406	k----dgiitytslyvdsqivkdyknkvlrdtrnvnyighidsmegksakpgkyaaladklisdrfnvpplhpqnhqldidgppkmellydpliplegphdvvisaadklkpqvtpmgtnsrtgkqheamtlagder
<i>C. showae RW3277</i>	406	k----dgiitytslyvdsqivkdyknkvlrdtrnvnyighidsmegksakpgkyaaladklisdrfnvpplhpqnhqldidgppkmellydpliplegphdvvisaadklkpqvtpmgtnsrtgkqheamtlagder
<i>C. showae CSUNSW</i>	406	k----dgiitytslyvdsqivkdyknkvlrdtrnvnyighidsmegksakpgkyaaladklisdrfnvpplhpqnhqldidgppkmellydpliplegphdvvisaadklkpqvtpmgtnsrtgkqheamtlagder
<i>C. concisus UNSW</i>	404	q----dgiitytslyvdsqivkdyknkvlrdtrnvnyighidsmegksakpgkyaaladklisdrfnvpplhpqnhqldidgppkmellydpliplegphdvvisaadklkpqvtpmgtnsrtgkqheamtlagder
<i>C. concisus 1382</i>	404	q----dgiitytslyvdsqivkdyknkvlrdtrnvnyighidsmegksakpgkyaaladklisdrfnvpplhpqnhqldidgppkmellydpliplegphdvvisaadklkpqvtpmgtnsrtgkqheamtlagder
<i>C. FOBRCl4</i>	405	k----dgiivsslyvdsqivkdyknkvlrdtrnvnyighidsmegksakpgkyaaladklisdrfnvpplhpqnhqldidgppkmellydpliplegphdvvisaadklkpqvtpmgtnsrtgkqheamtlagder
<i>C. showae CC57C</i>	406	k----dgiitytslyvdsqivkdyknkvlrdtrnvnyighidsmegksakpgkyaaladklisdrfnvpplhpqnhqldidgppkmellydpliplegphdvvisaadklkpqvtpmgtnsrtgkqheamtlagder
<i>C. fetus</i>	405	k----dgiitytslyvdsqivkdyknkvlrdtrnvnyighidsmegksakpgkyaaladklisdrfnvpplhpqnhqldidgppkmellydpliplegphdvvisaadklkpqvtpmgtnsrtgkqheamtlagder
<i>C. gracilis</i>	404	q----dgiitytslyvdsqivkdyknkvlrdtrnvnyighidsmegksakpgkyaaladklisdrfnvpplhpqnhqldidgppkmellydpliplegphdvvisaadklkpqvtpmgtnsrtgkqheamtlagder
<i>C. curvus 252.92</i>	404	q----dgiitytslyvdsqivkdyknkvlrdtrnvnyighidsmegksakpgkyaaladklisdrfnvpplhpqnhqldidgppkmellydpliplegphdvvisaadklkpqvtpmgtnsrtgkqheamtlagder
<i>D. acetiphilus</i>	402	e----egvitytslyvdsqivkdyknkvlrdtrnvnyighidsmegksakpgkyaaladklisdrfnvpplhpqnhqldidgppkmellydpliplegphdvvisaadklkpqvtpmgtnsrtgkqheamtlagder
<i>Sutterella sp.</i>	406	k----dgiitytslyvdsqivkdyknkvlrdtrnvnyighidsmegksakpgkyaaladklisdrfnvpplhpqnhqldidgppkmellydpliplegphdvvisaadklkpqvtpmgtnsrtgkqheamtlagder

*W. succinogenes*

S. gotlandica

S. autotrophica

S. denitrificans

S. denitrificans

S. SP. AST-10

S. SP. AST-10

N. saluginis

Nitratiruptor sp.

Sulfurovum sp.

C. rectus RM3267

C. shovae CSUN#

C. concisus UNSW

C. concisus 1382

C. FOBRIC14

C. shovae CC57C

C. fetus

C. gracilis

curvus 252\_92

D. acetiphilus

Sutterella sp.

"Linker" Region

*W. succinogenes*

S. gotlandica

S. autotrophica

S. denitrificans

S. denitrificans

S. SP. AST-10

S. SP. AST-10

N. saluginis

Nitratiruptor sp.

Sulfurovum sp.

C. rectus RM3267

C. shovae CSUN#

C. concisus UNSW

C. concisus 1382

C. FOBRIC14

C. shovae CC57C

C. fetus

C. gracilis

curvus 252\_92

D. acetiphilus

Sutterella sp.



<i>W. succinogenes</i>	812	dfiknpaskyeedvvtkmvnyfnlrmnpqhmndqgeikdiieyllkwidenaglf
<i>S. gotlandica</i>	823	kfiilnpemyddpvvksmidvfnlkmnpqhmndqetkdiieyllkwidenanlf
<i>S. autotrophica</i>	815	nfiilnpkskyhdpvvgmivnyfnlrmnpqhmntkeevnniveyfwkvdenanlf
<i>S. denitrificans</i>	813	dfimnpkemydepvvgmivnyfnlrmnpqhmndeketkniieyllkwvdenanlf
<i>S. denitrificans</i>	812	eyknpskfkepvmerlikffnlkmnpqhmndekdiieyfwkidenadlf
<i>S. sp. AST-10</i>	814	dfiilhpkekyedpvvksmidvfnlrmnpqhmnskeetkdiieyllkwvdenanlf
<i>S. sp. AST-10</i>	812	eyiknptskfhepvymkrmiefnlrmnpqhmndqgeikdiieyfwkidenadlf
<i>N. salsuginis</i>	816	ewilhpekmynnpviksntvnyfnlrmnpqhmntekqvddiieyllkwiknanlf
<i>Nitratiruptor sp</i>	815	efiknpksfyndpvvtklidyfnlrmnpqhmndqkdiieyllkwidqnanlf
<i>Sulfofurovum sp.</i>	814	qwmhpkekyddvviksmivnyfnlrmnpqhmnteeqtkdiieyllkwidenanlf
<i>C. rectus RM3267</i>	813	dfikdpakfyndevvksmidvfnlrmnpqhmndqgeikdiieyllkwidenagm-
<i>C. showae RM3277</i>	813	dfikdpakfyndevvksmidvfnlrmnpqhmndqgeikdiieyllkwidenagm-
<i>C. showae CGUNSW</i>	813	dfikdpksfyndevvksmidvfnlrmnpqhmndqgeikdiieyllkwidenagm-
<i>C. concisus UNSW</i>	811	dfikdpakfyndevvksmidvfnlrmnpqhmndqgeikdiieyllkwidenagm-
<i>C. concisus 1382</i>	812	dfikdpakfyndevvksmidvfnlrmnpqhmndqgeikdiieyllkwidenagm-
<i>C. FOBRG14</i>	812	dfikdpakfyndevvksmidvfnlrmnpqhmndqgeikdiieyllkwidenaglf
<i>C. showae CC57C</i>	813	dfikdpakfyndevvksmidvfnlrmnpqhmndqgeikdiieyllkwidenagm-
<i>C. fetus</i>	812	dfiknpaskyeedvvtkmvnyfnlrmnpqhmntdqeikdiieyllkwidenagln
<i>C. gracilis</i>	811	dfikdpakfyndevvksmidvfnlrmnpqhmndqgeikdiieyllkwidenagln
<i>C. curvus 252.92</i>	812	dfikdpakfyndevvksmidvfnlrmnpqhmndqgeikdiieyllkwidenaglf
<i>D. acetiphilus</i>	807	efikdpakpkynepvvkeyidyfnlrmnpqhmndqgeikdiieyfwkidenadlf
<i>Sutterella sp.</i>	810	eftlikpskfnepvvtkalieyfnlrmnpqhmnteaeskdiveymkwidenadlf

Alignment Nr. 3: Sequenzvergleich von dNosZ-Proteinen, welches mit dem Programm Clone Manager 9 erstellt und manuell bearbeitet wurde. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt. Die Zahlen am Anfang jeder Zeile zeigen die zugehörige Aminosäuresequenz-Nummerierung. Identische Aminosäuren sind rot hinterlegt. Die gekennzeichnete „Linker“ Region wurde durch ein Alignment mit NosZ aus *Pseudomonas stutzeri* bestimmt (siehe Kapitel 5.2.). Das Cytochrom c Bindemotiv im C-terminalen Bereich ist grün hinterlegt. Konservierte Aminosäuren im Bindemotiv des Kupfer Zentrums (Cu<sub>2</sub>) sind grau hinterlegt

<i>W. succinogenes</i>	1 mr-rewwiwwalmlgl---	sgdskeer--	akerfpts1-sevk--	ea-gmi----	liekgk-----	egenpfitnidge--	rqkvqfgeddnett--	ks-iga
<i>S. gotlandica</i>	1 mktskiqalaytlslf	fiagitgsdsadekqt	kkepska-a	eaap--	ki-evy-----	qnkdahaikev	kenkdsqsk-----	sydylnvksaydensmpanndasvrvkprti-ida
<i>S. autotrophica</i>	1 --mnksillastf--	liisfsaagdkdesdek	qidsvtataatp--	ki-evy-----	ankneyavkvksntde	inksgnksnfyydyg	ekseydnaqpanedasvrvtrtk-ida	
<i>S. denitrificans</i>	1 mkinkt-vlistvllsi--	fsgesdntkkesgqsa	asv--tsak--	si-evl-----	qnsdageikval	kevdanqsh-----	sydylnikeydmnskpanedasvrvtrtk-ida	
<i>S. sp. AST-10</i>	1 mkvskik---	istfaivlmvafsa	edsdkdkedr	gasvsn--	dap--	ki-evy-----	qnsdageikval	kevdanqsh-----
<i>N. salsuginis</i>	1 mrkmslw----	alsllalgtvg--	gkkesqsggega	naapqik--	vtqgavkiqkes	kseans-----	gqfyysnte-----	knssdenppkt-----
<i>Nitratiruptor sp</i>	1 mrvlhv-----	ivaivfivmgs	gsekkq-----	eteanapakit	vtqgavqrket	gsqssds-----	gkfyysn-----	kakkkqvedegay--
<i>Sulfurovum sp.</i>	1 mr-nk--	tlvslsgvsl--	ilaggepkksa	qkaasagivvte--	gavkal-----	ekeddsken	sqg-----	fysyn-----
<i>C. rectus RM3267</i>	1 mr-nkilgclmala	aaaaa---	itgeskddkksat	qaktqa-tpa--	aa-gmi-----	etqkadana	taq-----	kaydqfmsydingk--
<i>C. showae RM3277</i>	1 mr-nkilgclvala	aaaml---	itgeskddkksat	qaaktqa-tpa--	as-gmi-----	etqkadna	taq-----	kaydqfmsydingk--
<i>C. showae CSUNSW</i>	1 mr-nkilgcliala	aaaml---	itgeskddkksat	qaaktqa-tpa--	aa-gmi-----	etqkadana	taq-----	kaydqfmsydingk--
<i>C. concisus I382</i>	1 mr-v-----	lipliaaall--	fvvg--	eksedkaga	asegga-kva--	ts-asi-----	kveksennesan--	kqne-fikydmghe--
<i>C. concisus UNSW</i>	1 mr-a-----	liplvaall--	fvvg--	eksenkaga	asegga-kva--	ts-asi-----	kveksennesan--	kqne-fikydmghe--
<i>C. sp. FOBRCl4</i>	1 mr-y-----	ifvifafml--	fsgndkgddkng	tas---a-saq--	ta-gvi-----	kversasa	qps-----	r-sd-fvhydi dge--
<i>C. showae CC57C</i>	1 mr-nkilgclvala	aaaml---	itgeskddkksat	qaaktqa-tpa--	aa-gmi-----	etqkadana	taq-----	kaydqfmsydingk--
<i>C. fetus</i>	1 -m-nk--	tlifasafl--	lvgsqgdnk	fkdknet-knev-veq--	na-siv-----	vkksengvne	-----	kn--nwitvdi dge--
<i>C. gracilis</i>	1 mk-nsikfylcsa	aaall---	lcsqgddds	ssagns	vsqn-s-----	vs-sns-----	tpqsveqgnhtak	prsvksgeapkkddkfvsydfyge--
<i>C. curvus 525.92</i>	1 mr-y-----	ifvifafml--	fsgndkgddkng	tas---a-saq--	ta-gvi-----	nversasa	qps-----	r-sd-fvhydi dge--
<i>D. acetiphilus</i>	1 ----	mkhlvfvfllli--	gsteeknlt	pdpege	vq-----	vi-----	tgdi tmsk-----	di fvgysksgehi--
<i>Sutterella sp.</i>	1 maeqgfkcfytlsl	laavvvlva	ggseteka	etpaakp	ggtitvi--	sg-gds-----	aqerkssa-----	ftvvrge--
<i>W. succinogenes</i>	86 iasvkt-pydriniell	krlnksnfilks	achddyangli	gpsllkks	eevfdkiiay	ktkkanv	lmlrelvnmqdet	eirslakeisefnqgf--
<i>S. gotlandica</i>	107 nmhvsr-pyekiqvsm	lvkklks	efivks	achndyangvi	gpsllgkdsdy	iykklis	ftkgtksnplmndlv	vkmmndneikqmanefefnkei--
<i>S. autotrophica</i>	109 ythirs-pyervqvsl	lakqlsprflks	achddyangv	gpsllgrdad	viynkinaf	gskgkknvfmndli	ihmsdkei	rsiaedilvfnvqi--
<i>S. denitrificans</i>	104 nlhvrs-pyegveism	vvkklksnfilks	achndyangvi	gpsllskdad	ffekis	kfdksaknplmndlv	kmdkei	rsiaedilvfnvqi--
<i>S. sp. AST-10</i>	95 nmvrs-pyegveism	lvkklksnfilks	achddyangv	gpsllgkdsdy	iykklis	ftkgtksnplmndlv	kmdkei	rsiaedilvfnvqi--
<i>N. salsuginis</i>	88 ylhihs-pyeriqin	lmikklks	afivres	spchddyangvi	gpsllgkdsdy	iyqhlid	ftkgtksnplmndlv	kmdkei
<i>Nitratiruptor sp</i>	85 yrhivnn-yqkvqisl	wanklsk	afliys	achddyangli	gpsllgkdsdy	iyqhlid	ftkgtksnplmndlv	kmdkei
<i>Sulfurovum sp.</i>	89 yrdirs-pyervqit	lmvqqlspdyrlles	achddyangvi	gpsllgkdsdy	iyqhlid	ftkgtksnplmndlv	kmdkei	rsiaedilvfnvqi--
<i>C. rectus RM3267</i>	93 lamvrs-plqsinlik	liqqlsk	afivks	achddyangli	gpsllgkdsdy	iyqhlid	ftkgtksnplmndlv	kmdkei
<i>C. showae RM3277</i>	93 lamvrs-plqsinlik	liqqlsk	afivks	achddyangli	gpsllgkdsdy	iyqhlid	ftkgtksnplmndlv	kmdkei
<i>C. showae CSUNSW</i>	93 lamvrs-plqsinlik	liqqlsk	afivks	achddyangli	gpsllgkdsdy	iyqhlid	ftkgtksnplmndlv	kmdkei
<i>C. concisus I382</i>	85 lamvks-plqsinl	rlkgrlsk	afivks	achddyangli	gpsllgkdsdy	iyqhlid	ftkgtksnplmndlv	kmdkei
<i>C. concisus UNSW</i>	85 lamvks-plqsinl	rlkgrlsk	afivks	achddyangli	gpsllgkdsdy	iyqhlid	ftkgtksnplmndlv	kmdkei
<i>C. sp. FOBRCl4</i>	82 lamvks-plqsinl	rlkgrlsk	afivks	achddyangli	gpsllgkdsdy	iyqhlid	ftkgtksnplmndlv	kmdkei
<i>C. showae CC57C</i>	93 lamvrs-plqsinlik	liqqlsk	afivks	achddyangli	gpsllgkdsdy	iyqhlid	ftkgtksnplmndlv	kmdkei
<i>C. fetus</i>	84 lamtrt-plqsinlik	alrgrlsk	afivks	achddyangli	gpsllgkdsdy	iyqhlid	ftkgtksnplmndlv	kmdkei
<i>C. gracilis</i>	102 yssikn-qyekln	frldmkrllghd	filres	achddyangli	gpsllgkdsdy	iyqhlid	ftkgtksnplmndlv	kmdkei
<i>C. curvus 525.92</i>	82 lamvks-plqsinlik	alrgrlsk	afivks	achddyangli	gpsllgkdsdy	iyqhlid	ftkgtksnplmndlv	kmdkei
<i>D. acetiphilus</i>	75 vvtakstpygsig	lnmieklgks	yvvkap	chddyangvi	gpsllgkdsdy	iyqhlid	ftkgtksnplmndlv	kmdkei
<i>Sutterella sp.</i>	91 vvaarsspyasig	adlmgrlks	afliys	achddyangv	gpsllgkdsdy	iyqhlid	ftkgtksnplmndlv	kmdkei

Alignment Nr. 4: Alignment von NosC1-Proteinen, welches mit dem Programm Clone Manager 9 erstellt und manuell bearbeitet wurde. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt. Die Zahlen am Anfang jeder Zeile zeigen die zugehörige Aminosäuresequenz-Nummerierung. Identische Aminosäuren sind rot hinterlegt.

W. succinogenes  
S. gotlandica  
S. autotrophica  
S. denitrificans  
S. sp. AST-10  
N. salsuginis  
Nitratiruptor sp  
Sulfurovum sp.  
C. rectus  
C. showae RM3277  
C. showae CSUNSW  
C. concisus 1382  
C. concisus UNSW  
C. sp. FOBR14  
C. fetus  
C. gracilis  
C. curvus 525.92  
D. acetiphilus  
Sutterella sp.

1 mktgqiitlamgvvvalmylvalsggestpt-----pakpslapvseaaqlaqnpkeva-----leaeede-----mkkielqgsvknrelk--vshlys  
1 --mkniiavgaltliiglmlvft--amddpvyhghehskvie-----dfgtgdgnk-qhiv-is--tpeeksdreke-----nea-----lnalrkagnagafk--vsneyk  
1 --mrniiaigfillitliglmawv--asngaynggeagrite-----di-----gnr-vattkid--sepaksdreke-----nea-----ltalrdkagnigsfk--vsdeyk  
1 --mkniiavatlflilglmayt--askgrayhnggehakvie-----ni--gsntntqagaqkt--aspeeksdrke-----seq-----lkalkdkagnigeik--vsaeik  
1 --mkniiavgvltlfiavglmlvft--anddavfhghgqakvie-----df--gdgns-qqaanla--aspeeksdreke-----dea-----lkalrdkagnagifk--vsneyk  
1 --mirhiiiaaiaatlallawmyymyqlidveanrfeiqklertkmevkek--kep-tqvvaasap--sad--keakke-----delq--k-klkalreragnamafk--vsplyk  
1 --mirhiiiaaiaagaltvaaiilymanlidrevhrlqmihieiakse-----ni-----qevpmnkvy--qatsrqvgqkke-----enge-----eaklkvlkekagrksafk--vsplyr  
1 --mkhilaaiivtlalgalmfmyqsdrevnkleeiqkmiaktqikvkltdgtqpytqeapveknms--naadieseqakkk-----keld-----e-klqalqnkvsvanqpsg--vskryl  
1 --mgkkaaiaifgvlvialmfmfmltqpsa-----pikdasrpeikpaqg--tqpkaaneel-----nlq-dsee-----ikkikqlqnsvanqpsg--vskryl  
1 --mgkkaaiaifgvlvialmfmfmltqpsa-----pvkdasrpeikpaqg--tqpkvvneel-----nlq-dsee-----ikkikqlqnsvanqpsg--vskryl  
1 --mgkkaaiaifgvlvialmfmfmltqpsa-----pikdasrpeikpaqg--tqpkvvneel-----nlq-dsee-----ikkikqlqnsvanqpsg--vskryl  
1 --mkigkiiitilavliogimvmfmls-q--t-----ppkk--ekaasvq--pkveqnfkkqskseefa--sede-----lkkvkelssvaktqneg--vskryl  
1 --mraiip-----lvaaalifvgcekse-----nkageaaseqgavatsasiaveknennesankqnefikymhgeksvkgfiednnvsrqigalamvksplqsinlrlikgrlskdfi  
1 --mnigkivtiiliaigvcalmvmmfmlf-q--t-----pskkggeakaqasq--nnatqvsnaqasttienfa--ssee-----lqkikelagvsqnkaaeq--tsklyl  
1 --mnigkialgfgvviiflmgylmsgdag-----p--eakvaaqktqng--pekkavnnn-----dlatdaae-----lnkilelqslen--tndg--vsklyl  
1 --mkpgkilalilgvalialmalmfmasssgsg-----vpk--gegaqpvqg--tkpapqsksv-----dli-ddkd-----vknikilqgsvkerdfe--vsssyl  
1 --mnigkivtiiliaigvcalmvmmfmlf-q--t-----pskkggeakaqasq--nnatqvsnaqasttienfa--ssee-----lqkikelagvsqnkaaeq--tsklyl  
1 --mnkmtm--iiigvliilafllvgfssvesetvv-----sqaqevgvssegs-----vtees-----lkk-qvvselsnepgrae--rsknlyl  
1 --msfnkaiaatgcvlvagaagwmlwqandv--pvrkesadwrisnysnaekpaaagqetaakagdsafarklqteadkaafarpaetaare-----ktprnvvp-----aen-lsklyl

W. succinogenes  
S. gotlandica  
S. autotrophica  
S. denitrificans  
S. sp. AST-10  
N. salsuginis  
Nitratiruptor sp  
Sulfurovum sp.  
C. rectus  
C. showae RM3277  
C. showae CSUNSW  
C. concisus 1382  
C. concisus UNSW  
C. sp. FOBR14  
C. fetus  
C. gracilis  
C. curvus 525.92  
D. acetiphilus  
Sutterella sp.

87 lkcapchgydgegk-----iapsilgksetellaklrdykdedkvpsnlmkglitnstqgeledlakeiaagfsk-----  
89 skcsschgvngsgfgngksmngpkifgqteekiylkdldfakagrknmmimkgliliklndddlkrfakgefparekaaeekaakek--  
86 skcsschgvngsgmygkklngpkifgqsdelylklddfksgrknmmirgllhlsgddlkrakeigefparaeealnksk-----  
89 skcsachgangsgedgralmgpklyggsaeaklyldvfkagrknmmimkglintteeeelsyadeigafssqtqk-----  
88 skcsachgangsgyngkpmngppifgqseeeiylslvdfkagrknmmirgllhllededlrfakeigefpar-----akeeln  
100 qkcsschgvngsg-----li-gprliigksdyvlkaledfksgrknvnyngllskmdesqkkaledigtfeaklkaggn-----  
92 tncaschgingeg-----avgpkligkskeyilqalhdftgtrknyvnyngllqkladdakeelsteiasfaqmngsk-----  
103 qkcsschgvngsg-----li-gpklivglisaetvhqldtfdksgrknvnyngllskmnesgmqaladeigsfeqlkeq-----  
84 tscapchgangkg-----vmapsiagkskdeilaslnknykegvkvanlmglltnvsdkdglaladeiskfke-----  
84 tscapchgangkg-----vmapkiagkskdeilaslnknykenkvpsnlmkgltnvsdedlglaladeiskfke-----  
84 tscapchgangkg-----vmapsiagkskdeilaslnknykegvkvanlmglltnvsdedlglaladeiskfke-----  
86 tscapchgangkg-----vmapdithlksedllkkladykagkvqntlmkgltnvsdsdlnnladeiskfkk-----  
110 tkcsachddyang-----iigpslltksedeiylkminayknkcvnvmrldvkkmdeseirklakeisdfnaqfrskq-----  
90 tscapchgadgr-----vmapniagmdkeqlikklqdykagkvnslnmkglntsdadialladeiskfkk-----  
83 tscapchakdgkg-----viapsiagknkeeilarlhdycanlypntlmkvldnvsdenltalaeelslfk-----  
82 vscapchgdgrg-----kiappigkstkdiilaslnknykagkiknslmglltnvsdesldkladeiskfke-----  
90 tscapchgadgr-----vmapniagmdkeqlikklqdykagkvnslnmkglntsdadialladeiskfkk-----  
78 vkcapchsrdsqg-----vgaaiagmkkdilllklndykhgrvsnmsmglnmntdeeeinelaeelsgf-----  
107 vrcsachgrdgmgp-----vglp--iagkdyaynlklkkykaggvantmmadlitrtsdeelemlaevssffk-----

Alignment Nr. 5: Alignment von NosC2-Proteinen, welches mit dem Programm Clone Manager 9 erstellt und manuell bearbeitet wurde. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt. Die Zahlen am Anfang jeder Zeile zeigen die zugehörige Aminosäuresequenz-Nummerierung. Identische Aminosäuren sind rot hinterlegt.

---

## 7.2. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ad.	zu
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BICIN	N,N-Bis-2-Hydroxyethyl-Glycin
BHI	Brain Heart Infusion
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
BV	Benzylviologen
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
<i>cat</i>	Chloramphenicolresistenz-Gen
ca.	circa
<i>ccm</i>	Cytochrom <i>c</i> -Biogenesesystem
<i>cNosZ</i>	Cytochrom <i>c</i> Distickstoffmonoxid Reduktase
d	Küvetten-Schichtdicke
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
$\epsilon$	molarer Extinktionskoeffizient
E	Extinktion
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzymgebundener Immunnachweis
<i>et al.</i>	und andere
F	Verdünnungsfaktor
g	Gramm
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
k	kilo-
<i>kan</i>	Kanamycinresistenz-Gen
l	Liter

---

LB	Lysogeny broth
LMWC	Low Molecular Weight Cytochrome
m	milli-
$\mu$	mikro-
M	Molar
MCS	Multiple Cloning Site
min	Minute
MV	Methylviologen
n	nano-
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
<i>ompA</i>	Genabschnitt des outer membrane protein A, welcher für die Signalsequenz kodiert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	revolutions per minute (Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethyldiamin
<i>tet</i> -Promotor	Tetracyclin-Promotor
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
w/v	weight per volume (Gewichtseinheit pro Volumen)
z. B.	zum Beispiel

---

### 7.3. Publikationen

#### Publikationen in wissenschaftlichen Journalen

Luckmann, M., Mania, D., Kern, M., Bakken, L. R., Frostegård, Å., Simon, J. (in Vorbereitung)  
Production and consumption of nitrous oxide in nitrate-ammonifying *Wolinella succinogenes* cells.

#### Publikationen auf wissenschaftlichen Kongressen

Ergebnisse dieser Arbeit wurden regelmäßig auf wissenschaftlichen Kongressen präsentiert:

- Vortrag auf dem 18th European Nitrogen Cycle Meeting in Darmstadt, 18.-20. September 2013
- Posterpräsentation auf der Tagung der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM) in Bremen, 10.-13. März 2013
- Posterpräsentation auf dem 17th European Nitrogen Cycle Meeting in Oslo, 26.-28. September 2012
- Posterpräsentation auf der Tagung der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM) in Tübingen, 18.-21. März 2012
- Posterpräsentation auf der Tagung der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM) in Karlsruhe, 3.-6. April 2011

---

## 7.4. Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name: Monique Luckmann  
Geburtsdatum: 14.09.1984  
Geburtsort: Grevesmühlen

### Schulbildung

---

08/1995-07/2004 Abitur; Gymnasium am Tannenberg, Grevesmühlen

### Akademische Ausbildung

---

08/2010-02/2014 Promotionsarbeit bei Prof. Dr. Simon an der Technischen Universität Darmstadt  
Titel: „Untersuchungen zum N<sub>2</sub>O-Metabolismus des Nitrat-ammonifizierenden Bakteriums *Wolinella succinogenes*“

02/2010-07/2010 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Kardiovaskuläre Physiologie, Universitätsklinikum Frankfurt

2009 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Bahl an der Universität Rostock  
Titel: „Wachstum von *C. acetobutylicum* in Abhängigkeit externer Phosphatkonzentrationen und Inaktivierung des PhoP/R-Operons“

10/2006-09/2009 Hauptstudium Diplom-Biologie an der Universität Rostock

07/2007-12/2007 Stipendium im Rahmen des ERASMUS-Programms  
Studium der Biologie in Bergen, Norwegen

10/2004-09/2006 Grundstudium Diplom-Biologie an der Universität Rostock

---

## 7.5. Ehrenwörtliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Jörg Simon im Fachbereich Biologie, Fachgebiet *Mikrobielle Energieumwandlung und Biotechnologie*, der Technischen Universität Darmstadt in der Zeit von August 2010 bis März 2014 angefertigt.

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommene Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 11.03.2014

Monique Luckmann



---

## 8. Danksagung

---

An dieser Stelle möchte ich mich gerne bei allen Personen bedanken, die mich im Laufe meiner Promotionsarbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. Simon für die Bereitstellung des Themas, die Einführung in die Thematik und die Begutachtung der vorliegenden Arbeit.

Ebenfalls danken möchte ich Frau Dr. Kern für die Einführung in die grundlegenden Arbeitsmethoden zur Anzucht und genetischen Modifikation von *Wolinella succinogenes*.

Herrn Prof. Bakken, Frau Prof. Frostegård und Daniel Mania danke ich für die herzliche Aufnahme in ihrer Arbeitsgruppe sowie für die gute und produktive Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Klimmek danke ich für die vielen wissenschaftlichen Ratschläge und die sehr anregenden Diskussionen, bei denen es nie an Kreativität fehlte sowie für seine Bereitschaft die Arbeit Korrektur zu lesen.

Auch den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Doreen Haase, Tamara Heß und Gisela Schaffert möchte ich meinen Dank aussprechen, für all die fachlichen Ratschläge, die angenehme Arbeitsatmosphäre und weil Ihr immer „kurz“ Zeit für mich hattet.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Freund Thomas für ihre Unterstützung, ihre Geduld und dafür, dass sie immer für mich da sind.